



***Desenvolvimento de um logurte suplementado com
Spirulina platensis: Caracterização Físico-Química,
Microbiológica e Sensorial***

Vanessa de Sousa Mira

2015



***Desenvolvimento de um logurte suplementado com
Spirulina platensis: Caracterização Físico-Química,
Microbiológica e Sensorial***

Vanessa de Sousa Mira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Gestão da Qualidade e
Segurança Alimentar

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Susana Bernardino

2015

Título: Desenvolvimento de um iogurte suplementado com *Spirulina platensis*.

Copyright © Vanessa de Sousa Mira
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche
Instituto Politécnico de Leiria
2014

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria 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 objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus pais porque sem eles nunca teria chegado até esta etapa, por todo o apoio e compreensão que demonstraram.

Agradeço especialmente ao Fábio, por me ter sempre incentivado e aturado mesmo nos piores dias e por toda a força que me deu.

Deixo um agradecimento especial ao meu Pluto, que me fez companhia todos os dias e nunca me deixou sozinha.

Quero também agradecer aos meus amigos que me acompanharam ao longo destes 5 anos de estudo, em especial à Bárbara, ao Marco e à Sandra, por me terem sempre ajudado quando mais precisava e terem entrado na minha vida.

Deixo também um agradecimento muito especial à professora Susana Bernardino, pela sua orientação e sugestões, tendo-se demonstrado sempre disponível para me ajudar.

Agradeço também à professora Susana Mendes, pela sua ajuda e disponibilidade no tratamento estatístico dos resultados.

Agradeço a todos os técnicos responsáveis pelos laboratórios, pelo auxílio em alguns aspetos ao longo destes meses.

Quero também agradecer a todo o pessoal do GIRM, em especial ao André Horta, pelo seu acompanhamento e orientação durante as análises laboratoriais e provas sensoriais, ao Sidónio Rodrigues, por se ter mostrado sempre disponível para me ajudar e à Milene Vala, Patrícia Vala, Susete Pintéus, Luana Almeida, Carla Silva, Joana Silva, Cátia Silva e ao Celso Alves pela ajuda e disponibilidade para provar as amostras e/ou esclarecimento de algumas questões.

Resumo

O iogurte é um produto lácteo que é obtido a partir da acidificação controlada ou espontânea do leite, sendo o seu processo de fermentação desencadeado pela ação de culturas lácticas. Este produto apresenta propriedades benéficas para a saúde, como é o caso da regulação do balanço da microflora intestinal, melhoramento da resposta imunitária, redução dos sintomas alérgicos, redução do colesterol sérico e níveis séricos de glicose. Em relação à alga *S. platensis*, esta apresenta benefícios cardiovasculares, é eficaz no tratamento de certas alergias, cancro, doenças virais, hiperglicemia, imunodeficiência e processos inflamatórios. Esta dissertação teve como objetivo desenvolver um iogurte suplementado com a microalga *Spirulina platensis*, com posterior caracterização do produto final, em termos físico-químicos, microbiológicos e sensoriais.

Foram efetuadas várias experiências de receitas de iogurte até chegar à formulação final, tendo sido testadas diversas variantes.

Na avaliação da qualidade físico-química, o iogurte produzido com *Spirulina* apresentou ao longo do tempo sempre valores mais elevados nos seguintes parâmetros: teor de proteína bruta, teor de lactose, teor de fibras e hidratos de carbono. Foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros e o tipo de iogurte nos seguintes casos: teor de matéria gorda, teor de proteína bruta, teor de humidade, hidratos de carbono, valor energético e pH. Foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros e o tempo de produção apenas no teor de cinzas.

Na avaliação da qualidade microbiológica, o iogurte produzido com *Spirulina* não se destacou por apresentar valores mais elevados. Quando avaliados os fatores tipo de iogurte e tempo de produção, não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos parâmetros microbiológicos.

Na avaliação da qualidade sensorial, no iogurte produzido com leite meio gordo com lactose, foi possível verificar que todos os parâmetros sensoriais analisados e as amostras de iogurte são independentes. Em relação ao iogurte produzido com leite meio gordo sem lactose, verificou-se que os parâmetros doce e ácido não são independentes das amostras de iogurte. Em termos de preferência, 71% dos provadores escolheram o iogurte com agar. Relativamente à prova afetiva, não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre a amostra preferida e qualquer um dos fatores avaliados (idade e género

do provador). Em termos de preferência, 66% dos provadores escolheram o iogurte sem lactose. No que diz respeito à prova triangular, não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre as escolhas da amostra diferente e amostra preferida em relação ao gênero do provador. Apesar de 63% dos provadores terem preferido a amostra com 0 dias, apenas 44% conseguiram distinguir entre o iogurte com 0 dias e com 30 dias, o que sugere que mesmo ao fim de 1 mês, o iogurte continua agradável.

Com base em todos os resultados obtidos, conclui-se que o iogurte produzido com *S. platensis* é um produto inovador e saudável, pelos inúmeros benefícios presentes no iogurte, conjugados com os benefícios da microalga.

Palavras-chave: iogurte, *Spirulina*, lactose e leite

Abstract

Yogurt is a dairy product that is obtained from the spontaneous or controlled acidification of milk and its fermentation process is triggered by the action of lactic acid bacteria cultures. This product has properties beneficial to health, such as regulation of balance of intestinal microflora, improvement of immune response, reduction of allergic symptoms, reduce the serum cholesterol and serum glucose levels. Regarding *S. platensis* algae, it has cardiovascular benefits, is effective in the treatment of certain allergies, cancer, viral diseases, hyperglycemia, immunodeficiency and inflammatory processes. This work aimed to develop a yogurt supplemented with *Spirulina platensis* with subsequent characterization of the final product, in physico-chemical, microbiological and sensory terms.

Various experiences of yogurt recipes were made to reach the final formulation, have been tested several variants.

In the evaluation of the physico-chemical quality of the yoghurt produced with *Spirulina*, over time showed consistently higher values in the following parameters: protein content, lactose content, fiber content and carbohydrates. It was detected statistically significant differences between the parameters and the type of yogurt in the following cases: fat content, protein content, moisture content, carbohydrates, energy and pH. It was detected statistically significant differences between the parameters and the production time only in ash content.

In the evaluation of the microbiological quality, yogurt produced with *Spirulina* not stood out with higher values. When evaluated factors type of yogurt and production time, were not detected statistically significant differences in any of microbiological parameters.

In the evaluation of the sensory quality, in the yogurt produced with semi-skimmed milk with lactose, it was verified that all sensory parameters analyzed and yogurt samples are independent. Regarding the yogurt produced with skimmed milk lactose-free, it was found that the sweet and sour parameters are not independent of yogurt samples. In terms of preference, 71 % of the panellists chose the yogurt with agar. Regarding to effective test, it was not detected statistically significant differences between the favorite sample and any of the factors evaluated (age and gender of the panellist). In terms of preference, 66% of the panelists chose the yogurt lactose-free. As regards the triangular test, were not detected

statistically significant differences between the choices of different and favorite sample in relation to the gender of the panellist. Although 63% of the panellists have preferred the sample with 0 days, only 44% managed to distinguish between the yoghurt with 0 days and 30 days, which suggests that even after 1 month, the yogurt is still pleasant.

Based on all the results, it is concluded that the yogurt produced with *S. platensis* is an innovative and healthy product, by numerous benefits present in yogurt, combined with the benefits of microalgae.

Keywords: yogurt, *Spirulina*, lactose and milk

Índice Principal

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
1. Introdução.....	1
1.1 Produção de iogurte	3
1.2 Benefícios para a saúde	5
1.3 <i>Spirulina platensis</i>	7
1.4 Objetivo	11
2. Revisão da Literatura.....	13
3. Metodologia.....	17
3.1 Preparação das amostras	17
3.2 Análises Físico-Químicas.....	18
3.2.1 Determinação do Teor de Proteína Bruta.....	18
3.2.2 Determinação do Teor de Matéria Gorda.....	19
3.2.3 Determinação da Acidez	20
3.2.4 Determinação do Teor de Lactose	20
3.2.5 Determinação do Teor de Fibras.....	21
3.2.6 Determinação da Cinza Total.....	22
3.2.7 Determinação do Teor de Umidade	22
3.2.8 Determinação da Atividade Antioxidante.....	23
3.2.9 Determinação do pH	23
3.2.10 Determinação da Cor	24
3.3 Análises Microbiológicas.....	24
3.3.1 Microrganismos Totais (Aeróbios e Anaeróbios) a 20°C	24
3.3.2 <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>).....	25
3.3.3 Enterobactérias.....	25
3.3.4 <i>Salmonella</i>	26
3.3.5 <i>Listeria monocytogenes</i> (<i>L. monocytogenes</i>).....	27
3.3.6 <i>Lactobacillus</i> sp.	28
3.3.7 <i>Streptococcus</i>	29
3.4 Análise Sensorial	29
4. Discussão de Resultados.....	33

4.1 Análises Físico-Químicas.....	33
4.1.1 Tratamento Estatístico	35
4.1.2 Determinação do Teor de Proteína Bruta.....	37
4.1.3 Determinação do Teor de Matéria Gorda.....	39
4.1.4 Determinação da Acidez	40
4.1.5 Determinação do Teor de Lactose	41
4.1.6 Determinação do Teor de Fibras.....	42
4.1.7 Determinação da Cinza Total.....	44
4.1.8 Determinação do Teor de Humidade	45
4.1.9 Determinação da Atividade Antioxidante.....	47
4.1.10 Determinação do pH	48
4.1.11 Determinação da Cor	50
4.1.12 Determinação dos Hidratos de Carbono	51
4.1.13 Determinação do Valor Energético.....	53
4.2 Análises Microbiológicas.....	55
4.2.1 Tratamento Estatístico	56
4.2.2 Microrganismos Totais Aeróbios	57
4.2.3 Microrganismos Totais Anaeróbios	58
4.2.4 <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>).....	60
4.2.5 Enterobactérias.....	60
4.2.6 <i>Salmonella</i>	60
4.2.7 <i>Listeria monocytogenes</i> (<i>L. monocytogenes</i>).....	61
4.2.8 <i>Lactobacillus</i> sp.	61
4.2.9 <i>Streptococcus</i>	62
4.3 Análise Sensorial	64
4.3.1 Tratamento Estatístico	64
4.3.2 Prova de Aceitação de Iogurte produzido com Leite Meio Gordo com Lactose.....	65
4.3.3 Prova de Aceitação de Iogurte produzido com Leite Meio Gordo sem Lactose.....	68
4.3.4 Prova Afetiva	70
4.3.5 Prova Triangular	71
5. Conclusão.....	73
6. Referências Bibliográficas.....	77

7. Anexos.....	81
7.1 Anexo 1 – Metodologia	81
7.1.1 Preparação das Amostras.....	81
7.1.2 Determinação do Teor de Proteína Bruta.....	82
7.1.3 Determinação do Teor de Matéria Gorda.....	83
7.1.4 Determinação do Teor de Fibras.....	83
7.1.5 Determinação da Cinza Total.....	84
7.1.6 Determinação da Atividade Antioxidante.....	84
7.1.7 Análise Sensorial	85
7.2 Anexo 2 – Determinação do Teor de Proteína Bruta.....	86
7.3 Anexo 3 – Determinação do Teor de Matéria Gorda	91
7.4 Anexo 4 – Determinação da Acidez	96
7.5 Anexo 5 – Determinação da Cinza Total.....	99
7.6 Anexo 6 – Microrganismos Totais (Aeróbios e Anaeróbios) a 20°C	102
7.7 Anexo 7 – <i>Listeria monocytogenes</i>	110
7.8 Anexo 8 – Folha de Prova de Aceitação	120
7.9 Anexo 9 – Folha de Prova de Aceitação	121
7.10 Anexo 10 – Folha de Prova Afetiva	122
7.11 Anexo 11 – Folha de Prova Triangular	123
7.12 Anexo 12 – Tratamento Estatístico dos Resultados	124
7.12.1 Parâmetros Físico-Químicos.....	124
7.12.2 Parâmetros Microbiológicos	130
7.12.3 Análise Sensorial	131

Índice de Figuras

- Figura 1.1 - Representação esquemática da percentagem populacional a nível mundial que apresenta intolerância à lactose.....2
- Figura 4.1 - Representação gráfica (CanoDraw) do PCA com base nos parâmetros físico-químicos (Proteína, Matéria Gorda, Lactose, Cinzas, Humidade, Hidratos de Carbono, Valor Energético, Redução de DPPH e Cor), em relação às diferentes amostras e respetivos tempos (logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30).....35
- Figura 4.2 - Representação gráfica (CanoDraw) do PCA com base nos parâmetros físico-químicos (Acidez e pH), em relação às diferentes amostras e respetivos tempos (logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30).....37
- Figura 4.3 - Comparação dos valores médios do teor proteico, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das duas experiências independentes realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de proteína. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras logurte Ct_0 (*) com logurte A_30 (‡).....38
- Figura 4.4 - Comparação dos valores médios do teor de matéria gorda, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das duas experiências independentes realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de matéria gorda. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras logurte Ct_0 (*), com logurte A_0 (#), com logurte Ct_30 (†), com logurte A_30 (‡).....39
- Figura 4.5 - Comparação dos valores médios de Acidez, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das duas experiências independentes realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de acidez. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).....41
- Figura 4.6 - Comparação dos valores médios do teor de lactose, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se

aos valores obtidos na base de cálculo Megazyme. As colunas representam os valores médios de lactose.....42

Figura 4.7 - Comparação dos valores médios do teor de fibras, quando comparadas as amostras logurte Ct_0 e logurte A_0. Os resultados referem-se à média das duas experiências independentes realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de fibras.....44

Figura 4.8 - Comparação dos valores médios da cinza total, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das duas experiências independentes realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de cinza. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras logurte Ct_0 (*), com logurte A_0 (#), com logurte Ct_30 (†), com logurte A_30 (‡).....45

Figura 4.9 - Comparação dos valores médios do teor de humidade, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das duas experiências independentes realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de humidade. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras logurte Ct_0 (*), com logurte A_0 (#), com logurte Ct_30 (†), com logurte A_30 (‡).....46

Figura 4.10 - Comparação dos valores médios da redução do DPPH, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das duas experiências independentes realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de redução do DPPH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).....48

Figura 4.11 - Comparação dos valores médios de pH, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras logurte Ct_0 (*), com logurte A_0 (#), com logurte Ct_15 (§), com logurte A_15 (¥), com logurte Ct_30 (†) e com logurte A_30 (‡).....49

Figura 4.12 - Comparação dos valores médios da cor, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se ao valor de ΔE , obtido a partir da média das três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios da Cor. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).....50

Figura 4.13 - Comparação dos valores médios dos hidratos de carbono, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se ao cálculo efetuado a partir dos valores médios de proteína, cinzas, matéria gorda e humidade, realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de hidratos de carbono. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras logurte Ct_0 (*), com logurte A_0 (#), com logurte Ct_30 (†) e com logurte A_30 (‡).....52

Figura 4.14 - Comparação dos valores médios do valor energético, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se ao cálculo efetuado a partir dos valores de proteína, matéria gorda e hidratos de carbono, realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios do valo energético. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras logurte Ct_0 (*) com logurte A_30 (‡).....54

Figura 4.15 - Representação gráfica (CanoDraw) do PCA com base nos parâmetros microbiológicos (Microrganismos Totais Aeróbios, Microrganismos Totais Anaeróbios, *Lactobacillus sp.* e *Streptococcus*), em relação às diferentes amostras e respetivos tempos (logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30).....56

Figura 4.16 - Comparação dos valores médios dos microrganismos totais aeróbios, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das contagens por placa, tendo em conta o fator de diluição. As colunas representam os valores médios dos M_aero.....58

Figura 4.17 - Comparação dos valores médios dos microrganismos totais anaeróbios, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das contagens por placa,

tendo em conta o fator de diluição. As colunas representam os valores médios dos M_anaero.....	59
Figura 4.18 - Comparação dos valores médios de <i>Lactobacillus</i> sp., quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das contagens por placa, tendo em conta o fator de diluição. As colunas representam os valores médios de <i>Lactobacillus</i> sp.....	62
Figura 4.19 - Comparação dos valores médios de <i>Streptococcus</i> , quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das contagens por placa, tendo em conta o fator de diluição. As colunas representam os valores médios de <i>Streptococcus</i>	63
Figura 4.20 - Representação gráfica da solução proveniente da análise fatorial, após rotação.....	66
Figura 4.21 - Representação gráfica da intensidade avaliada pelos provadores.....	67
Figura 4.22 - Representação gráfica da preferência por parte dos provadores.....	68
Figura 4.23 - Representação gráfica da solução proveniente da análise fatorial, após rotação.....	69
Figura 4.24 - Representação gráfica da intensidade avaliada pelos provadores.....	70
Figura 4.25 - Representação gráfica da preferência por parte dos provadores.....	70
Figura 4.26 - Representação gráfica da preferência por parte dos provadores entre o iogurte com lactose e o iogurte sem lactose.....	71
Figura 4.27 - Representação gráfica da preferência por parte dos provadores entre o iogurte com 0 dias e o iogurte com 30 dias.....	72
Figura 7.1.1 - Frascos de Vidro com logurte suplementado com Espirulina.....	81
Figura 7.1.2 - Registo da variação da temperatura registada pela sonda introduzida na iogurteira.....	81

Figura 7.1.3 - Armazenamento dos frascos de iogurte no frigorífico devidamente identificados, para posterior realização de análises.....	81
Figura 7.1.4 - Digestor (Digestor 2006 Foss, Tecator Technology).....	82
Figura 7.1.5 - Destilador (Foss, Kjeltex TM 2100, Tecator Technology).....	82
Figura 7.1.6 – Solução após a titulação.....	82
Figura 7.1.7 – Separação de fases ao fim de 30 minutos.....	83
Figura 7.1.8 - Evaporação do éter no evaporador rotativo (Laborota 4000, Heidolph).....	83
Figura 7.1.9 – Filtração num cadinho de goosh.....	83
Figura 7.1.10 – Mufla (Controller B170, Nabertherm).....	84
Figura 7.1.11 - Extratos para análise da atividade antioxidante provenientes do iogurte com alga (2 tubos falcon à esquerda) e do iogurte controlo (2 tubos falcon à direita).....	84
Figura 7.1.12 – Tabuleiro distribuído a cada provador na prova afetiva.....	85
Figura 7.12 – Teste do DCA para verificação da adequabilidade do teste PCA em relação aos parâmetros físico-químicos (Proteína, Matéria Gorda, Cinzas, Humidade, Hidratos de Carbono, Valor Energético, DPPH, Cor e Lactose).....	129
Figura 7.12.1 – Teste do PCA, sendo possível observar a percentagem que cada eixo explica da variabilidade dos dados, relativamente aos parâmetros físico-químicos (Proteína, Matéria Gorda, Cinzas, Humidade, Hidratos de Carbono, Valor Energético, DPPH, Cor e Lactose).....	129
Figura 7.12.2 – Teste do DCA para verificação da adequabilidade do teste PCA em relação aos parâmetros físico-químicos (Acidez e pH).....	130
Figura 7.12.3 – Teste do PCA, sendo possível observar a percentagem que cada eixo explica da variabilidade dos dados, relativamente aos parâmetros físico-químicos (Acidez e pH).....	130

Figura 7.12.4 – Teste do DCA para verificação da adequabilidade do teste PCA em relação aos parâmetros microbiológicos (Microrganismos Totais Aeróbios, Microrganismos Totais Anaeróbios, <i>Lactobacillus</i> sp. e <i>Streptococcus</i>).....	131
Figura 7.12.5 – Teste do PCA, sendo possível observar a percentagem que cada eixo explica da variabilidade dos dados, relativamente aos parâmetros microbiológicos (Microrganismos Totais Aeróbios, Microrganismos Totais Anaeróbios, <i>Lactobacillus</i> sp. e <i>Streptococcus</i>).	131
Figura 7.12.6 – Scree Plot.....	134
Figura 7.12.7 – Scree Plot.....	138

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Estabilizadores utilizados no iogurte.....	5
Tabela 1.2 – Composição média nutricional da microalga <i>Spirulina platensis</i> , expressa em g/100g de peso seco, que foi utilizada na formulação do iogurte.....	11
Tabela.4.1 – Resultados obtidos nas diferentes análises químicas, onde iogurte Ct1, Ct2 e Ct3 correspondem às três repetições para cada amostra controlo, iogurte Ct_0, Ct_15 e Ct_30 correspondem às médias das três repetições, iogurte A1, A2 e A3 correspondem às três repetições para cada amostra com alga, iogurte A_0, A_15 e A_30 correspondem às médias das três repetições e, por fim, DP corresponde ao desvio padrão associado a cada média, respetivamente.	33
Tabela.4.2 – Resultados obtidos nas diferentes análises microbiológicas, onde iogurte Ct_0, A_0, Ct_15, A_15, Ct_30 e A_30 correspondem às médias das duas repetições em cada fator de diluição.....	55
Tabela.4.3 – Resultados obtidos na <i>Component Score Coefficient Matrix</i>	66
Tabela.4.3.1 – Resultados obtidos na <i>Component Score Coefficient Matrix</i>	69
Tabela.7.12.1 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.	124
Tabela.7.12.2 – Teste Kruskal-wallis para o teor de Gordura.	124
Tabela.7.12.3 – Teste de Comparações múltiplas, teste Gomes-Howell (Post Hoc), para o teor de Gordura.....	124
Tabela.7.12.4 – Teste ANOVA para o teor de Proteína, Cinzas, Humidade, Hidratos, Calorias e DPPH.....	125
Tabela.7.12.5 – Teste de comparações múltiplas, Teste Gomes-Howell (Post Hoc), para o teor de Proteína, Humidade., Hidratos e Calorias.....	125
Tabela.7.12.6 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.....	126
Tabela.7.12.7 – Teste Kruskal-wallis para o pH.....	126

Tabela.7.12.8 – Teste de Comparações múltiplas, teste Gomes-Howell (Post Hoc), para o pH.....	127
Tabela.7.12.9 – Teste ANOVA para a Acidez.....	127
Tabela.7.12.10 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.....	127
Tabela.7.12.11 – Teste ANOVA para o teor de Proteína, Gordura, Cinzas, Humidade, Hidratos, Calorias, DPPH, Cor e Lactose.....	127
Tabela.7.12.12 – Teste de Comparações múltiplas, teste Gomes-Howell (Post Hoc), para as Cinzas.....	128
Tabela.7.12.13 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.....	129
Tabela.7.12.14 – Teste Kruskal-wallis para a Acidez e pH.....	129
Tabela.7.12.15 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.....	130
Tabela.7.12.16 – Teste Kruskal-wallis para os Microrganismos Totais Aeróbios, Microrganismos Totais Anaeróbios e <i>Streptococcus</i>	130
Tabela.7.12.17 – Teste ANOVA para os <i>Lactobacillus</i> sp.....	130
Tabela.7.12.18 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.....	131
Tabela.7.12.19 – Teste Kruskal-wallis para os Microrganismos Totais Aeróbios, Microrganismos Totais Anaeróbios, <i>Lactobacillus</i> sp. e <i>Streptococcus</i>	131
Tabela.7.12.20 – Resultados obtidos na prova sensorial de aceitação efetuada entre 3 amostras de iogurte produzido com leite meio gordo com lactose, em termos de aceitabilidade e intensidade. A escala varia de 1 a 9 e a mesma encontra-se devidamente descrita no tópico 3.4.....	132
Tabela.7.12.21 – Matriz de Correlação, onde é visível os pontos de correlação mais fortes, assim como as relações estatisticamente significativas.....	133
Tabela.7.12.22 – Teste de KMO e Bartlett, onde KMO de 0,754 considerado médio para utilização da análise fatorial.....	133

Tabela.7.12.23 – Matriz Anti-imagem, onde o tamanho da amostra é considerado adequado pois todos os valores da diagonal estão acima de 0,5.....	133
Tabela.7.12.24 – Tabela de Comunalidades.....	134
Tabela.7.12.25 – Tabela da Variância Total Explicada.....	134
Tabela.7.12.26 – Matriz dos Componentes após rotação.....	135
Tabela.7.12.27 – Tabela com valores da análise <i>Reliability</i>	135
Tabela.7.12.28 – Teste de Independência do Qui-Quadrado, quando o fator analisado foi a amostra de iogurte	135
Tabela.7.12.29 – Resultados obtidos na prova sensorial de aceitação efetuada entre 3 amostras de iogurte produzido com leite meio gordo sem lactose, em termos de aceitabilidade e intensidade. A escala varia de 1 a 9 e a mesma encontra-se devidamente descrita no tópico 3.4.....	136
Tabela.7.12.30 – Matriz de Correlação, onde é visível os pontos de correlação mais fortes, assim como as relações estatisticamente significativas.....	136
Tabela.7.12.31 – Teste de KMO e Bartlett, onde KMO de 0,663 considerado medíocre para utilização da análise fatorial.....	137
Tabela.7.12.32 – Matriz Anti-imagem, onde o tamanho da amostra é considerado adequado pois todos os valores da diagonal estão acima de 0,5.....	137
Tabela.7.12.33 – Tabela de Comunalidades.....	138
Tabela.7.12.34 – Tabela da Variância Total Explicada.....	138
Tabela.7.12.35 – Matriz dos Componentes após rotação.....	138
Tabela.7.12.36 – Tabela com valores da análise <i>Reliability</i>	139

Tabela.7.12.37 – Teste de Independência do Qui-Quadrado, quando o fator analisado foi a amostra de iogurte	139
Tabela.7.12.38 – Resultados obtidos na prova afetiva entre o iogurte com lactose (567) e o iogurte sem lactose (891).....	139
Tabela.7.12.39 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.	140
Tabela.7.12.40 – Teste Kruskal-wallis para a Amostra Preferida.....	140
Tabela.7.12.41 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.	140
Tabela.7.12.42 – Teste ANOVA para a Amostra Preferida.....	141
Tabela.7.12.43 – Resultados obtidos na prova triangular entre o iogurte com 0 dias (456,789) e o iogurte com 30 dias (123).....	141
Tabela.7.12.44 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.	141
Tabela.7.12.45 – Teste ANOVA para a Amostra Preferida e Amostra Diferente.....	141

Lista de Abreviaturas

INE – Instituto Nacional de Estatística

NYA – Nacional Yogurt Association

WHO – World Health Organization

USDA – United States Department of Agriculture

NIH – National Institutes of Health

NP – Norma Portuguesa

CE – Comunidade Europeia

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

HDL – High Density Lipoproteins

PUFA – Polyunsaturated Fatty Acids

hs-CRP – high sensitivity C-reactive protein

LAB – Lactic Acid Bacteria

ufc – unidades formadoras de colónias

ANOVA – Análise de Variância

PCA – Principal Component Analysis

DCA – Detrended Correspondence Analysis

Sig, nível de significância – limite que se toma como base para afirmar que um certo desvio é decorrente do acaso ou não

P value - estatística utilizada para sintetizar o resultado de um teste de hipóteses; é definido como a probabilidade de se obter uma estatística de teste igual, assumindo verdadeira a hipótese nula

logurte Ct – logurte Controlo

logurte Ct_0 – logurte Controlo aos 0 dias

logurte Ct_15 – logurte Controlo aos 15 dias

logurte Ct_30 – logurte Controlo aos 30 dias

logurte A – logurte com Alga (*Spirulina*)

logurte A_0 – logurte com Alga aos 0 dias

logurte A_15 – logurte com Alga aos 15 dias

logurte A_30 – logurte com Alga aos 30 dias

M_aero – Microrganismos Totais Aeróbios

M_anaero – Microrganismos Totais Anaeróbios

E. coli – *Escherichia coli*

L. monocytogenes – *Listeria monocytogenes*

1. Introdução

O iogurte é um produto com origem desconhecida, mas sabe-se que o leite fermentado já estava a ser utilizado nos tempos pré-históricos. As antigas tribos orientais que eram pastores nómadas preservavam o seu leite, obtido a partir de vacas, ovelhas, cabras, éguas e camelos-fêmeas em recipientes feitos a partir da pele ou estômago destes animais. Segundo a lenda, o iogurte foi descoberto graças a um pastor que se esqueceu do leite num destes recipientes durante algum tempo e quando finalmente se lembrou, encontrou o leite transformado em algo mais denso e saboroso (Roberto Flora, 2002).

O iogurte é um produto lácteo que é obtido a partir da acidificação controlada ou espontânea do leite, ocorrendo por meio da lactase, proteína com atividade enzimática, que é responsável pela hidrólise da lactose (açúcar do leite) nos seus componentes mais simples, a glicose e a galactose. Por sua vez, a glicose é convertida em ácido láctico, através da redução de ácido pirúvico. Ao ser reduzida a quantidade de lactose presente no iogurte, este torna-se num produto mais adequado mesmo para quem sofre de intolerância à lactose, que é causada pela ausência da lactase. A intolerância à lactose é um problema que tem vindo a afetar cada vez mais a população, sendo que as estatísticas variam de raça para raça e de país para país (Figura 1.1). O consumo de leite também varia bastante mundialmente, visto que em certas zonas da Europa, como é o caso da Suécia, são consumidos entre 200 a 300 kg/pessoa/ano, enquanto por exemplo na China o consumo de leite é bastante reduzido, com valores aproximados de 37 kg/pessoa/ano (Starr, 2012). Como é possível verificar a partir da Figura 1.1, mais de 90% da população da China apresenta intolerância à lactose. Em relação aos Estados Unidos, a intolerância à varia de acordo com a raça, sendo que cerca de 74% dos Americanos com descendência africana, 87% dos Indianos e 14% dos Caucasianos sofrem desta intolerância (Starr, 2012; Roberto Flora, 2002).

No caso de Portugal, de acordo com dados obtidos a partir do INE, em 2009, foi observado que, dos laticínios o mais consumido é o leite, de forma destacada com 87 kg/pessoa/ano, sendo seguido pelos leites acidificados (nesta categoria incluem-se os iogurtes) com 19,9 kg/pessoa/ano (ASAE, 2013). Em relação à intolerância à lactose, cerca de 54% da população portuguesa apresenta esta intolerância (Starr, 2012).

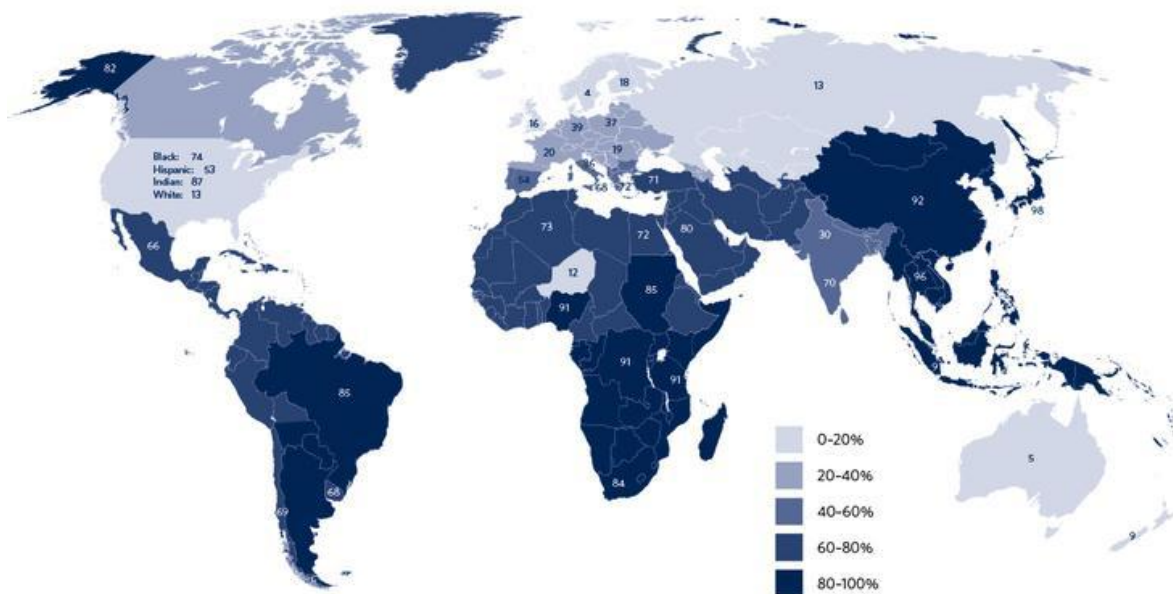


Figura 1.1 - Representação esquemática da porcentagem populacional a nível mundial que apresenta intolerância à lactose.

(<http://cdn.foodbeast.com.s3.amazonaws.com/content/wp-content/uploads/2012/11/Global-Lactose-Intolerance.png>)

Quando o organismo não produz lactase suficiente (hipolactásia ou deficiência da lactase), a lactose permanece “inteira” no intestino, podendo causar sintomas de desconforto abdominal. A lactase é produzida na mucosa intestinal, na zona superficial das microvilosidades do intestino delgado. A sua localização superficial torna-a vulnerável a qualquer agressão à mucosa intestinal, podendo deixar de ser produzida temporariamente até à recuperação da mucosa ou permanentemente se a lesão for irreversível (Roberto Flora, 2002; Mimosa, 2013).

O processo de fermentação do leite é desencadeado pela ação de culturas lácticas que pertencem a dois grupos principais de bactérias: *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, geralmente designado *Lactobacillus bulgaricus*. Estas bactérias são as mais utilizadas como culturas de arranque para a produção de iogurte, estando autorizadas pela WHO. As bactérias mencionadas apresentam uma relação simbiótica, sendo organismos unicelulares e termófilos, o que significa que se propagam melhor num ambiente quente. De acordo com um estudo que verificou qual a temperatura ótima de crescimento das bactérias lácticas, foi verificado que em relação a *S. thermophilus*, a sua temperatura ótima de crescimento varia entre os 35°C e os 42°C, enquanto a de *L. bulgaricus* varia entre 43°C a 46°C (Radke, 1986). Um dos principais fatores que afetam a viabilidade e a funcionalidade das culturas é a pós-acidificação que pode ocorrer no produto final fermentado durante o armazenamento refrigerado, devido a possível atividade residual das estirpes, em especial de *L.*

bulgaricus. A parte lipídica do iogurte permanece quase idêntica ao leite original, enquanto as proteínas (caseína) são parcialmente hidrolisadas, tornando-se mais digeríveis. Devido ao elevado nível de acidez do iogurte, este estimula o desenvolvimento da flora bacteriana intestinal, que é capaz de bloquear com sucesso os fenômenos de putrefação que ocorrem no intestino humano (Cheryl Sternman Rule, 2015; Roberto Flora, 2002; Lahtinen et al, 2012; Radke-Mitchell et al, 1986).

Embora o iogurte tenha uma composição de micronutrientes semelhantes ao leite, é altamente concentrado em cálcio, proteínas, vitaminas e minerais, tais como a vitamina B₂ (riboflavina) e B₁₂, vitamina D, magnésio, potássio, fósforo e zinco. Existem valores mínimos na composição do iogurte, tais como no caso da percentagem de proteína, que deve ser no mínimo 2,7% (m/m), deve ter menos que 15% (m/m) de gordura e a soma dos microrganismos que constituem a cultura de arranque deve ter um valor base de 10⁷ ufc/g (Codex Alimentarius, 2011). O que realmente diferencia o iogurte dos outros alimentos são os probióticos, que são definidos como microrganismos vivos que após a sua ingestão em quantidade suficiente, exercem benefícios à saúde do hospedeiro. De acordo com a NYA, os iogurtes são alimentos probióticos, visto que as culturas de arranque (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) presentes no mesmo, desde que se encontrem viáveis, ativas e abundantes, fornecem um efeito benéfico na digestão da lactose e eliminam os sintomas de intolerância à lactose. Outra evidência da capacidade do iogurte exercer efeitos probióticos está relacionada com a recuperação significativa de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* nas fezes humanas, estando de acordo com estudos anteriores que relatam a atividade metabólica das bactérias do iogurte no trato digestivo de animais e humanos. Além das culturas de arranque normalmente presentes no iogurte, podem ser adicionadas outras culturas probióticas, como *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* (Buttriss, 1997; Cheryl Sternman Rule, 2015; NYA, 2006; Guarner, 2005; Mater et al, 2005; Codex Alimentarius, 2011).

1.1 Produção de iogurte

O iogurte é tradicionalmente produzido através de quatro etapas principais. Em primeiro lugar, o leite é aquecido a aproximadamente 82^oC. Este processo de aquecimento elimina quaisquer microrganismos prejudiciais que já podem estar presentes no leite, fornecendo uma nova base na qual novas culturas desejáveis podem crescer. O aquecimento do leite desnatura as proteínas do soro de leite, para que estas se possam

associar com as micelas da caseína. O tratamento térmico do leite é considerado um fator crítico para a formação de textura. Não existe um tempo definido em relação ao leite permanecer a esta temperatura antes do arrefecimento, sendo uma questão de preferência. A manutenção do leite com temperatura elevada antes do arrefecimento tende a melhorar a gelificação, criando uma textura mais grossa e mais firme. De seguida, o leite é arrefecido até aos 46^oC, aproximadamente. Esta é a gama de temperatura na qual as culturas de arranque, quando adicionadas, vão prosperar. Em terceiro lugar, o leite é inoculado com as culturas de arranque (*L. bulgaricus* e *S. thermophilus*), podendo estas estar sob a forma de cultura de iogurte em pó (geralmente liofilizado) contendo bactérias vivas ou serem uma pequena porção de iogurte caseiro ou de compra. Por fim, a fermentação é iniciada. Ao manter a temperatura perto dos 43^oC ao longo da incubação, as culturas de arranque começam a converter lactose em ácido láctico, diminuindo o pH do leite e provocando a coagulação das proteínas do leite e a formação do coalho, fazendo com que este engrosse e adquira o sabor amargo característico do iogurte natural. Este processo demora várias horas. Assim que o pH se encontrar abaixo de 4.6, o iogurte pode ir para o frigorífico, permanecendo neste algumas horas antes de ser consumido (Cheryl Sternman Rule, 2015; Soukoulis et al, 2007).

No caso da produção industrial do iogurte, esta envolve muita tecnologia e ingredientes de qualidade. Inicialmente é efetuada uma seleção das matérias-primas a utilizar, que devem ser de alta qualidade e não devem conter nenhum tipo de impurezas impróprias para a produção de iogurtes. A principal preocupação no leite a utilizar para a produção de iogurte é a qualidade bacteriana e a presença de inibidores. A ação inibitória dos antibióticos contra as culturas lácticas causa perdas na produção, sendo que *S. thermophilus* é particularmente sensível a antibióticos. O processo produtivo está dividido em várias fases: mistura, homogeneização, pasteurização, fermentação, arrefecimento, embalagem e conservação. Na etapa de mistura, é efetuada a padronização do leite em relação ao teor de gordura desejável e são adicionados os ingredientes ao leite num tanque hermético que não permite a entrada de qualquer corpo estranho e/ou bactérias indesejáveis. Consoante o tipo de iogurte (iogurtes lights, com 0% de gordura e sem adição de açúcar ou iogurtes com gordura), a mistura é efetuado em tanques diferentes, sendo nesta fase que são adicionados os aditivos como os aromatizantes, conservantes, corantes e estabilizadores (Tabela 1.1). Na homogeneização, a mistura dos produtos com gordura passa por um Homogeneizador que trabalha a alta pressão e que tem como objetivo a redução do tamanho dos glóbulos de gordura de modo a obter uma

consistência lisa e cremosa no produto final. De seguida, através de um Pasteurizador, toda a mistura do iogurte é aquecida a uma temperatura suficiente para eliminar todas as bactérias indesejáveis que possam estar presentes na mistura. Na etapa de fermentação, a lactose é transformada em ácido láctico que será o agente de coagulação do leite. A fermentação ocorre a uma temperatura à volta dos 42 a 43^oC durante aproximadamente 4 horas. Neste tempo, a formação de acidez e aroma é controlada. Quando o produto atinge a acidez desejada, este é arrefecido e enviado para outro tanque hermético onde é necessário ter muito cuidado para que nenhuma das características obtidas até esta fase sejam perdidas. De seguida, o iogurte é embalado em máquinas de alta tecnologia sem nenhum contacto manual, de forma a manter toda a sua qualidade. A temperatura ideal de conservação do iogurte varia de 1 a 10^oC e o seu tempo de validade é de aproximadamente 35 dias. Todas as etapas de produção são cuidadosamente controladas e os produtos finalizados só são colocados à venda após a sua aprovação. No caso de o iogurte ser de aroma ou com frutas, estas são adicionadas sob a forma de polpa ou pedaços após o arrefecimento do iogurte (www.danone.com.br; Ramesh C. Chandan, 2006).

Tabela 1.1 - Estabilizadores utilizados no iogurte. (Ramesh C. Chandan, 2006)

Stabilizer	(%) Concentration in Yogurt Mix
Whey protein concentrate (34%, 50%, or 80% protein) or/and milk-protein concentrate	0.7–1.5
Starch, modified (tapioca/corn)	0.8–2.0
Gelatin (225/250 Bloom)	0.1–0.5
Agar	0.25–0.70
Pectin (low methoxy for yogurt)	0.08–0.20
Pectin (high methoxy for yogurt beverages)	0.30–0.50
Locust bean gum (in combination)	0.3–0.5
Xanthan gum (in combination)	0.01–0.05
Carrageenan (in combination)	0.01–0.05
Natural corn starch	1.5–2.0
Carboxymethyl cellulose	0.1–0.2

1.2 Benefícios para a saúde

As propriedades funcionais do iogurte são consistentes com evidências adicionais obtidas que confirmam a viabilidade e a atividade metabólica das bactérias do iogurte no intestino humano, pois ajudam a regular o balanço da microflora intestinal. O iogurte é utilizado no tratamento de perturbações agudas no trânsito intestinal, como recomendado pela WHO. Outros estudos têm abordado o papel do iogurte no sistema imunitário, em que o seu consumo pode melhorar a resposta imunitária, particularmente em populações imunocomprometidas, como os idosos. Foi também verificado que o consumo de iogurte a

longo prazo, em comparação com a exclusão por completo de iogurtes da alimentação durante 1 ano, foi associado com uma redução significativa dos sintomas alérgicos. Relativamente ao efeito do consumo de iogurte probiótico no colesterol, foi verificado que em alguns estudos clínicos *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* reduzem o colesterol sérico significativamente (Guarner et al, 2005).

Já foi verificado que indivíduos com um elevado consumo de iogurte (mais de 4 iogurtes por semana) apresentam maior densidade mineral óssea, em comparação com indivíduos que não consomem iogurte. O cálcio presente no iogurte tem uma maior biodisponibilidade em relação ao cálcio do leite devido ao pH ácido do iogurte, o qual ioniza o cálcio, facilitando a sua absorção e fortalecendo os ossos (Unal, 2005).

Foi demonstrado que o consumo de iogurte probiótico reduz significativamente os níveis de HbA1c e diminui os níveis séricos de glicose, sugerindo que deve ser usado como uma abordagem e método de tratamento preventivo para controlar complicações diabéticas. O termo “HbA1c” refere-se a hemoglobina glicosilada, que é desenvolvida quando a hemoglobina se junta com a glicose presente na corrente sanguínea, sendo “glicosilada”. Através da medição de HbA1c, os médicos conseguem obter uma visão global dos nossos níveis médios de açúcar no sangue ao longo de um período de semanas/meses. Para indivíduos com diabetes, esta medição é muito importante pois quanto mais elevados os níveis de HbA1c, maior o risco de desenvolver complicações relacionadas com diabetes (Mohamadshahi et al, 2014; www.Diabetes.co.uk).

Apesar da evidência limitada, o consumo de iogurte tem sido inversamente associado ao aumento de peso, síndrome metabólica e diabetes tipo II (Tong et al, 2011; Ivey et al, 2011; Mozaffarian et al, 2011; Beydoun et al, 2008).

Outro estudo indicou que o consumo de iogurte probiótico por 9 semanas numa mulher grávida reduz significativamente os níveis de hs-CRP (high sensitivity C-reactive protein) no sangue. Esta proteína pode ser utilizada para detetar baixos níveis de inflamação crónica, sendo um melhor preditor de eventos cardiovasculares, em comparação com outros biomarcadores inflamatórios (Asemi et al, 2011; <http://www.docsoinion.com/health-and-nutrition/hscrp/>).

1.3 *Spirulina platensis*

As microalgas, também conhecidos como fitoplâncton, são um grupo diversificado de organismos eucariotas fotossintéticos unicelulares que não apresentam raízes, caules e folhas. Devido à sua composição unicelular, as microalgas são produtores extremamente eficazes de energia, sendo que algumas espécies convertem a luz solar, água e dióxido de carbono em óleo natural (forma líquida de energia), hidratos de carbono e proteínas. Estes microrganismos vivem tipicamente em ambientes de água salina mas existem também em água doce e têm a capacidade de crescer rapidamente e sobreviver em condições adversas (calor, frio, anaerobiose, salinidade e exposição a radiação UV), mais uma vez graças à sua disposição unicelular que lhes permite serem muito adaptáveis ao meio envolvente. O seu tamanho varia desde alguns micrómetros a algumas centenas de micrómetros, tendo sido estimado que existem desde 2×10^5 a 8×10^5 espécies (Se-Kwon Kim, 2015). As microalgas produzem importantes produtos bioativos, tais como polímeros, péptidos, ácidos gordos, carotenóides, toxinas e esteróis. As três classes mais importantes de microalgas em termos de abundância são as diatomáceas (Bacillariophyceae), as algas verdes (Chlorophyceae), e as algas douradas (Chrysophyceae). As microalgas têm sido vastamente utilizadas para várias aplicações, incluindo nutrição humana e animal, cosméticos, produtos farmacêuticos, produção de bioenergia e remoção de nutrientes das águas residuais. As propriedades biológicas das algas e os seus componentes estão bem estudados nas seguintes áreas de pesquisa: antioxidantes, agentes antimicrobianos, agentes anticancerígenos, saúde anti-inflamatória e cardiovascular, anti-obesidade e atividade antidiabética (Se-Kwon Kim, 2015; WEISS Alisson, 2014).

As cianobactérias são microalgas verde-azuladas procariotas, como é o caso da *Spirulina* (*Arthrospira platensis* e *Arthrospira maxima*) que é fotossintética e autotrófica. Relativamente à taxonomia, o género *Spirulina* pertence ao Reino Bacteria, Filo Cyanobacteria, Subclasse *Oscillatoriothycideae* e Ordem *Oscillatoriales*, compreendendo o grupo das cianobactérias filamentosas. De acordo com Latysheva et al. (2012), as cianobactérias foram os primeiros organismos a libertar oxigénio para a atmosfera como um subproduto da fotossíntese. A microalga *Spirulina*, apesar de ser unicelular é caracterizada por se agrupar, originando tricomas que são filamentos na forma de espiral. É pela sua forma característica de espiral que surge o nome *Spirulina*. A *Spirulina* foi “redescoberta” nos anos 60, quando Jean Léonard, botânico presente em expedição franco-belga em África, descreveu um bolo azul-esverdeado, encontrado no mercado de

Fort Lamy, em Chad. Estudos posteriores revelaram que este bolo, chamado localmente de dihé, continha uma alga azul-esverdeada identificada como *Spirulina*. Essa alga era consumida pela tribo Kanembu, que vivia nas margens do lago Chad e Niger. Os integrantes desta tribo apresentavam constituição física diferenciada, pois cerca de 70% dos alimentos consumidos eram algas. Paralelamente ao “descobrimento” de *Spirulina* em África, o Instituto Francês do Petróleo recebeu um pedido da Companhia Sosa Texcoco, localizada próxima à cidade do México: o estudo de uma alga que vivia nos lagos de produção de carbonato de sódio e aparecia com a evaporação da água. Como resultado, o primeiro estudo detalhado dos requerimentos nutricionais e da fisiologia de *Spirulina* foi realizado. Esta alga surgiu, em períodos diferentes da história humana, tendo sido o alimento dos Astecas no México, do povo Kanembu durante séculos em África e ainda usada em sopas em algumas partes do Sudeste da Ásia, há mais de mil anos atrás. Nos tempos atuais, os humanos têm consumido *Spirulina* como alimento, em especial por ser uma fonte rica de proteína, vitaminas, sais minerais e ácidos gordos ómega-6. O uso de *Spirulina* é uma das alternativas mais claras para a solução dos problemas de nutrição da sociedade do futuro (Se-Kwon Kim, 2015; Derner et al, 2006).

Existem vários fatores que podem influenciar o crescimento de *Spirulina platensis*, como o pH, salinidade, luminosidade, presença de contaminantes, temperatura, níveis de oxigénio dissolvido e tipo de biorreator. Mesmo tendo uma boa adaptação em água salgada, são poucas as estirpes que crescem no mar, porque o baixo teor em carbonatos e as elevadas concentrações de magnésio e cálcio existentes na água marinha inibem o seu desenvolvimento (Henrikson, 1994; Pirt, 1975).

A microalga *Spirulina platensis* tem inúmeras aplicações biotecnológicas. Relativamente aos pigmentos fotossintéticos, a *Spirulina* é responsável pela produção de β -caroteno, zeaxantina, ficocianina e aloficocianina, sendo que a ficocianina é uma ficobiliproteína de cor azul com atividade antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora e hepatoprotetora, assim como um potencial agente quimioterapêutico e hipocolesterolémico, pois o seu consumo pode levar à redução dos níveis de colesterol no sangue, através do aumento dos níveis HDL, que pode conduzir a funções cardiovasculares saudáveis. Este pigmento é produzido pelas cianobactérias, o qual é usado como corante natural nos alimentos (gomas, doces, geleias, gelados e bebidas) e cosméticos (sombra de olhos). Este pigmento é estável em preparações secas, mas é sensível a elevadas temperaturas e à luz. De acordo com um estudo (Pulz and Gross,

2004), foi verificado que o potencial antioxidante desta microalga pode aumentar até duas ou três vezes, em situação de stress de oxigénio.

No que diz respeito ao biodiesel, as cianobactérias secretoras de ácidos gordos são consideradas uma tecnologia promissora na produção de biodiesel renovável, sendo que o elevado custo da colheita e de recuperação da biomassa associada com a necessidade de ter culturas em massa de microalgas ser um dos principais obstáculos para a implementação em larga escala da produção de biodiesel a partir de microalgas. Segundo Vonshask (1997), a disponibilidade de luz é um dos principais problemas observados no cultivo fotoautotrófico de microalgas. A luz tem que ser continuamente fornecida ao sistema porque não pode ser acumulada. A limitação do crescimento em culturas densas pode ocorrer devido ao sombreamento provocado pelas próprias células à medida que ocorre o crescimento, impedindo que parte da cultura receba a incidência da luz. Para o caso específico da *Spirulina*, o fenómeno do sombreamento ocorre em concentrações superiores a 0.5 g.L⁻¹. Segundo outro estudo (Hu and Richmond, 1996), a produtividade de biomassa de culturas de *Spirulina* estavam dependentes da velocidade de agitação ou taxa de arejamento, sendo que estes fatores devem ser considerados num design de fotobiorreator de forma a atingir máxima eficiência fotossintética e produção de biomassa.

Relativamente à aquacultura, a *Spirulina* é bastante utilizada na alimentação direta ou indireta de algumas espécies de peixes, moluscos, crustáceos e de diversos organismos de interesse económico.

Em relação aos benefícios para a saúde humana, a *Spirulina* apresenta benefícios cardiovasculares que são essencialmente resultado da sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e hipolipidémica. De acordo com um estudo (Chamorro et al, 2002), já foi provado in vivo e in vitro que a *Spirulina* é eficaz no tratamento de certas alergias, anemia, cancro, hepatotoxicidade, doenças virais e cardiovasculares, hiperglicemia, hiperlipidemia, imunodeficiência e processos inflamatórios. Esta microalga é considerada uma boa fonte de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e aminoácidos essenciais (leucina, isoleucina e valina), além de ser uma fonte rica de ácido linoleico, o qual auxilia no combate do envelhecimento precoce da pele, prevenindo a formação de rugas. O género *Spirulina* está classificado como alimento complementar e como sendo uma fonte rica de nutrientes (Tabela 1.2), tais como vitaminas B, ficocianina, clorofila, vitamina E, ácidos-gordos

ómega-6 e muitos minerais, tais como potássio, cálcio, crómio, cobre, ferro, magnésio, manganésio, fósforo, selénio, sódio e zinco (Se-Kwon Kim, 2015). O género *Spirulina* possui dez vezes mais β -caroteno quando comparado com qualquer outro alimento, e mais vitamina B12 do que alguma planta fresca ou alimento de origem animal. No que diz respeito aos hidratos de carbono, a *Spirulina* é principalmente composta por glucose, ramnose, manose, xilose, e galactose, sendo utilizada como suplemento na perda de peso, controlo da diabetes e hipertensão. Algumas conclusões apontam para a necessidade de um processamento eficiente e técnicas de engenharia de modo a formular nutrientes de um modo digerível para os humanos, devido aos potenciais efeitos secundários que podem surgir após o consumo de *Spirulina*, tais como reações alérgicas, diarreia, náuseas e vómitos.

Por fim, em relação à segurança alimentar da microalga, várias cianobactérias contêm um certo nível de toxinas, o qual se tornou num grave problema para a saúde pública devido ao aumento das ocorrências de “blooms” de cianobactérias tóxicas, que em conjunto com as algas produzem hepatotoxinas chamadas microcistinas que se acumulam no fígado, podendo causar cancro ou outras doenças hepáticas. Esta toxina com baixos níveis de exposição pode ter efeitos crónicos nos humanos. Por este motivo, a *Spirulina* foi sujeita a vários testes de segurança em humanos, animais e peixes em muitos países, sendo que até ao momento não houve qualquer relato de toxinas presentes. Apesar de este género não conter normalmente toxinas, é possível a contaminação de culturas ao ar livre por outras cianobactérias. Com um controlo adequado da cultura de *Spirulina*, é muito improvável que ocorra problemas relacionados com toxinas (Se-Kwon Kim, 2015; Derner et al, 2006).

Tabela 1.2 - Composição média nutricional da microalga *Spirulina platensis*, expressa em g/100g de peso seco, que foi utilizada na formulação do iogurte.

(BioSamara)

Componente	<i>Spirulina platensis</i>
Protein	56,6
Fat	4,1
Carbohydrates	11,3
Fibre	16,4
Sodium	0,3
Chlorophyll	1,179
Beta-carotenoids	0,137
Vitamin B1 (thiamin)	0,0014
Vitamin B2 (riboflavin)	0,0069
Vitamin B3 (niacin)	0,0059
Vitamin E	0,013
Linolenic Acid	0,940
Phycocyanin	12,8

1.4 Objetivo

Este trabalho tem como principal objetivo efetuar o desenvolvimento de um iogurte suplementado com a microalga *Spirulina platensis*, com posterior caracterização do produto final, em termos físico-químicos, microbiológicos e sensoriais.

2. Revisão da Literatura

Na literatura científica, existem muitos estudos sobre os benefícios para a saúde do iogurte, assim como da alga *Spirulina platensis*. Em relação às características físico-químicas também já existem alguns artigos, no entanto, relativamente aos aspetos microbiológicos e sensoriais, estes já não são encontrados com tanta facilidade, referindo-se maioritariamente às LAB e aos fatores que influenciam o seu crescimento, assim como os seus benefícios no trânsito intestinal (Mater et al., 2005; Radke-Mitchell et al., 1986).

Mater et al. (2005) elaboraram um estudo acerca da sobrevivência das bactérias lácticas presentes no iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*) após passagem pelo trato gastrointestinal humano. Foram investigadas estas bactérias nas fezes humanas, recorrendo ao meio de cultura seletivo. Os 13 sujeitos que participaram neste teste ingeriram iogurte fresco pelo período de 12 dias, tendo sido detetado nas amostras ambas as bactérias viáveis, em quantidades médias de $6,3 \times 10^4$ UFC g⁻¹ em relação a *S. thermophilus* e $7,2 \times 10^4$ UFC g⁻¹ em relação a *L. delbrueckii*, respetivamente. Estes resultados sugerem que uma quantidade substancial de bactérias lácticas presentes no iogurte consegue sobreviver ao trânsito gastrointestinal humano.

Radke-Mitchell et al. (1986) elaboraram um estudo acerca da influência da temperatura no crescimento associativo de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. As temperaturas testadas foram 37°C, 42°C e 45°C até o pH atingir o valor de 4,2. O número de células foi superior em 93,3% no caso de *S. thermophilus*. Foram testadas 9 estirpes de *S. thermophilus*, nas quais a temperatura ótima de crescimento variou entre os 35°C e os 42°C e 10 estirpes de *L. bulgaricus*, nas quais a temperatura ótima de crescimento variou entre os 43°C e os 46°C.

Num outro estudo foi verificado o efeito de diferente rácio de bactérias (*L. bulgaricus*, *S. thermophilus* e *Bifidobacterium longum*) nas características do iogurte em diferentes períodos de armazenamento, Sabbah et al. (2012), onde as amostras de iogurte foram armazenadas a 4°C por 28 dias. Foram testados 2 fatores, onde fator A é o rácio entre as culturas de arranque *S. thermophilus* + *L. bulgaricus* e *B. longum* (T1 é o controlo a 4% das culturas de arranque, T2 1:3 (v/v), T3 2:2 (v/v), T4 3:1 (v/v)). O fator B é o período de armazenamento (1 e 21 dias) para análises organolépticas, físicas e químicas e (1, 14, 21 e 28 dias) para análises microbiológicas. Os resultados indicaram que o

iogurte produzido com 3% (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) e 1% de *B. longum* durante o período de armazenamento (1 e 21 dias) a 4°C afetou significativamente o aumento da acidez e sólidos totais do iogurte, de forma mais acentuada em relação a qualquer outro tratamento. Além disso, este rácio entre as culturas de arranque também obteve pontuação mais elevada no sabor e textura pelos provadores.

Em relação aos benefícios para a saúde do consumo de iogurte existem vários artigos, como os efeitos na obesidade e na prevenção de diabetes tipo 2 (Beydoun et al., 2008; Mohamadshahi et al., 2014). Por outro lado, tem existido uma grande controvérsia em relação ao efeito probiótico dos iogurtes, se por si só são ou não considerados probióticos, independentemente das culturas de arranque presentes (Guarner et al., 2005).

Beydoun et al. (2008) elaboraram um estudo sobre a associação entre o consumo de uma variedade de produtos lácteos e os seus nutrientes com a obesidade, obesidade central e síndrome metabólica, numa tentativa de explicar algumas diferenças étnicas nos resultados metabólicos através do consumo de laticínios usando dados nacionais, desde 1999 a 2004. O tamanho das amostras variou entre 4519 para a síndrome metabólica e 14 618 para a obesidade. Foi verificada uma associação inversa significativa entre o consumo de leite, iogurte, cálcio e desordens metabólicas e de magnésio. Vários produtos lácteos podem ter diferentes associações com desordens metabólicas, incluindo a obesidade. As diferenças étnicas no consumo de laticínios podem explicar em parte as disparidades étnicas em desordens metabólicas na população dos Estados Unidos.

Mohamadshahi et al. (2014) elaboraram um estudo acerca do efeito entre iogurte convencional e probiótico nos marcadores inflamatórios em pacientes com diabetes tipo 2. Participaram neste estudo 44 pacientes com diabetes tipo 2, que foram divididos em 2 grupos, grupo controlo e grupo de intervenção. No grupo de intervenção os pacientes consumiram 300g/dia de iogurte probiótico e os pacientes do grupo controlo consumiram 300g/dia de iogurte convencional, ambos durante 8 semanas. Os resultados obtidos sugeriram que o iogurte probiótico pode ser usado como uma abordagem alternativa na prevenção e método de tratamento para controlar as complicações diabéticas.

Relativamente ao efeito probiótico presente no iogurte, Guarner et al. (2005), elaboraram um estudo relacionado com o consumo de iogurte que tem mostrado possuir

bastantes benefícios para a saúde relacionados com a presença de bactérias vivas e que por outros estudos efetuados em humanos que mostraram a existência de bactérias viáveis (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) que melhoram a digestão da lactose e eliminam sintomas de intolerância à lactose. Assim, estas culturas claramente preenchem o presente conceito de probióticos.

Em relação à alga *S. platensis*, também existem artigos que mencionam os seus benefícios com atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e hipolipidémica (Deng et al., 2010). Além destes benefícios, tem sido também utilizado como suplemento para perda de peso, controlo de diabetes, elevada pressão sanguínea e hipertensão (Kim, S.K., 2015).

Deng et al. (2010) elaboraram um estudo que esclarece o facto dos benefícios cardiovasculares de Spirulina serem essencialmente resultado das suas atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e hipolipidémica. As descobertas nos testes clínicos humanos são bastante consistentes com o efeito hipolipidémico de Spirulina observado em estudos pré-clínicos, sendo que a maioria dos testes clínicos têm tamanho de amostra limitado. As atividades antioxidantes e anti-inflamatórias foram demonstradas num elevado número de estudos pré-clínicos, tendo sido efetuado um número limitado de estudos até ao momento, de modo a confirmar tais atividades em humanos, sendo necessário avançar neste sentido para ser possível tirar mais conclusões.

Em relação à atividade antimicrobiana exercida por *S. platensis*, Kim, S.K. (2015) menciona no seu livro que as culturas de microalgas de Spirulina têm demonstrado significativa atividade anti-bacteriana contra seis estirpes de *Vibrio*: *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. scophthalmi*, *V. alginolyticus* e *V. lentus* (Kokou et al., 2012) Além disso, a C-ficocianina purificada a partir de *S. platensis* inibiu bastante o crescimento de algumas bactérias resistentes aos medicamentos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Sarada et al., 2011).

3. Metodologia

3.1 Preparação das amostras

Inicialmente foram efetuadas várias experiências de receitas de iogurte até chegar à formulação final. As variantes testadas foram: tipo de iogurte, tipo de leite, tempos de fermentação, tipo e concentração de espessante e tipo e quantidade de açúcar. Em relação ao tipo de iogurte, foram testados o iogurte natural, iogurte natural sem lactose e iogurte grego natural. Relativamente ao tipo de leite, foi testado o leite meio-gordo e leite sem lactose. No que diz respeito aos tempos de fermentação, estes variaram entre 6-12h, dependendo do tipo de leite utilizado. Em relação ao espessante utilizado, foram experimentados o leite em pó magro, uma mistura de grau alimentício de emulsionante, farinha de tapioca, amido de milho, estabilizadores e agar. Por fim, relativamente ao tipo de açúcar, foram testados o açúcar branco e o açúcar amarelo. A formulação final foi atingida através da realização de provas sensoriais.

As amostras de iogurte (dia 0 e dia 30) foram preparadas da seguinte forma, de acordo com a receita otimizada: no robot de cozinha BIMBY, foram inicialmente adicionados apenas o leite (Mimosa) e o agar (Panreac, Espanha) a 50°C, 3,5 min, com velocidade 4, sendo posteriormente adicionados os restantes ingredientes, o iogurte natural açucarado sem lactose (Nutrégi), o açúcar (Intermarché) e a alga (BioSamara). O preparado foi distribuído por 8 frascos de vidro onde foram colocados cerca de 100 gramas por cada um dos frascos (anexo 7.1.1, figura 7.1.1). Antes da utilização da iogurteira (Tefal, YG 10011) foi efetuada uma monitorização da temperatura, a partir de uma sonda (HI141C) introduzida no interior da mesma, sendo que a gama de temperatura situou-se num intervalo de 41,3-45,4°C (anexo 7.1.1, figura 7.1.2). Após 8 horas e 30 minutos de fermentação foram retirados os frascos da iogurteira e colocados no frigorífico a aproximadamente 4°C para conservação até à realização das provas sensoriais e análises laboratoriais (anexo 7.1.1, figura 7.1.3). Este procedimento foi repetido na preparação das amostras de iogurte controlo, que continham os mesmos ingredientes e as mesmas quantidades, com exceção da alga.

O leite sem lactose analisado foi comprado (Mimosa), assim como o iogurte natural açucarado sólido (Nutrégi), a alga em pó (BioSamara) e o açúcar (Intermarché).

Para todas as amostras foram realizadas, em duplicado, as seguintes análises químicas: determinação das proteínas, determinação da matéria-gorda, determinação da

acidez, determinação da lactose, determinação das fibras, determinação das cinzas e determinação da atividade antioxidante. Apenas as seguintes análises foram realizadas em triplicado: determinação do pH e determinação da cor. As análises químicas não foram realizadas em triplicado pelo facto de a iogurteira apenas ter capacidade para fermentar 8 frascos de iogurte de cada vez e ser necessário que ambas as análises químicas e microbiológicas tivessem origem no mesmo lote, para obtenção de resultados mais fiáveis.

3.2 Análises Físico-Químicas

Todas as pesagens necessárias foram efetuadas em balança analítica (Explorer Pro-EP213, OHAUS).

3.2.1 Determinação do Teor de Proteína Bruta

A Norma utilizada para a determinação em causa foi a Norma Portuguesa 1986 de 1991, a qual foi anulada em 2007 e substituída por EN ISO 8968-1:2001. De acordo com esta Norma (NP 1986:1991), entende-se por teor de proteína bruta o resultado que se obtém multiplicando pelo fator 6,38 o teor de azoto, doseado segundo a técnica de Kjeldahl. Esta encontra-se no anexo 7.2.

O procedimento seguido foi o seguinte, resumidamente: pesou-se aproximadamente 2 g de amostra e, num tubo de digestão, colocou-se a toma da amostra, duas pastilhas de catalisador (selénio e cobre) e 25 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado, 95 a 97% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Foram preparados dois tubos com amostra de iogurte com alga, dois tubos com amostra de iogurte controlo (sem alga) e dois tubos para o ensaio em branco (apenas com 2 pastilhas e 25 ml de ácido sulfúrico). O digestor (Digester 2006 Foss, Tecator Technology) foi previamente programado para a temperatura de 220^oC e em seguida foram colocados os tubos no digestor e ligou-se a torneira da água. Passados 30 minutos, o digestor foi reprogramado para 400^oC, permanecendo a esta temperatura por 90 minutos. Após este tempo, o digestor foi desligado e deixou-se a torneira da água aberta até ao arrefecimento dos tubos (cerca de 60 minutos) (anexo 7.1.2, figura 7.1.4). Após o arrefecimento dos tubos foi ligado o destilador (Foss Kjeltec 2010, Tecator Technology) que se encontra representado no anexo 7.1.2, figura 7.1.5, e após o seu aquecimento, foram adicionados a cada tubo 80 ml de água destilada. De seguida, foi realizado o ensaio em branco (tubo que contém somente os 25 ml de ácido sulfúrico e 2 pastilhas de catalisador), tendo-se colocado no

Erlenmeyer 30 ml de solução de ácido bórico (H_3BO_3) a 4% com indicador (Panreac, Espanha) e carregou-se no botão que corresponde à adição de 100 ml de hidróxido de sódio (NaOH) a 40%, o qual inicia o processo de destilação. Depois foi efetuado o mesmo procedimento para os tubos que continham as amostras. Após a destilação foi realizada uma titulação com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M (Panreac, Espanha) como titulante. O ponto de viragem foi atingido quando a solução verde mudou para azul acinzentado (anexo 7.1.2, figura 7.1.6).

3.2.2 Determinação do Teor de Matéria Gorda

Esta determinação foi baseada na Norma Portuguesa 468 de 1990 (anexo 7.3), que é o processo de referência para a determinação do teor de matéria gorda em leite gordo, meio gordo e magro e leites compostos. Esta Norma foi anulada em 2007 e substituída por EN ISO 1211:2001. Segundo a Norma (NP 468:1990), entende-se por matéria gorda o conjunto das substâncias extraídas por solventes orgânicos e determinadas de acordo com a técnica de Röse-Gottlieb.

O procedimento seguido foi o seguinte, de forma resumida: numa ampola de decantação, foram introduzidos 10 ml da amostra (iogurte controlo e iogurte com algas), rigorosamente pesados. Foram adicionados 2 ml de amónia a 25% (Panreac, Espanha), agitou-se durante 30 segundos, foram acrescentados 10 ml de álcool etílico a 95% (aga, Portugal) e agitou-se novamente. De seguida foram adicionados 25 ml de éter dietílico (Panreac, Espanha), rolhou-se e agitou-se energeticamente durante 30 segundos, abrindo por vezes a torneira, de modo a libertar a acumulação de vapores. Depois foram introduzidos 25 ml de éter de petróleo (Panreac, Espanha) e procedeu-se como anteriormente. A ampola de decantação ficou em repouso durante 30 minutos para separação de fases (anexo 7.1.3, figura 7.1.7). Após o tempo de repouso, a camada etérea foi decantada para um balão de 250 ml tarado, previamente seco a 100-105^oC. Procedeu-se a mais duas extrações da fase aquosa nas mesmas condições, recolhendo as fases etéreas no mesmo balão. De seguida, o éter foi evaporado num evaporador rotativo (Laborota 4000, Heidolph) (anexo 7.1.3, figura 7.1.8). Por fim, secou-se o balão em estufa (WTB 7200, Binder) a uma temperatura de 100-105^oC durante cerca de 24 horas, tendo o balão arrefecido em exsiccador.

3.2.3 Determinação da Acidez

A Norma utilizada para a determinação da acidez foi a Norma Portuguesa 470 de 1983 (anexo 7.4), a qual se destina a leites e compostos. De acordo com esta Norma, entende-se por acidez de um leite o volume de solução alcalina normal, expresso em mililitros (ml), necessário para neutralizar 1 litro (l) de leite.

Para a determinação da acidez, procedeu-se da seguinte forma: inicialmente foram pesados 10 g de amostra (iogurte controlo e iogurte com algas), aos quais foram adicionadas seis gotas de solução alcoólica de fenolftaleína (Panreac, Espanha). Com agitação, através de um agitador magnético (Velpr Científica), foi efetuada a titulação com a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N (Panreac, Espanha) como titulante, até viragem do indicador.

3.2.4 Determinação do Teor de Lactose

Esta determinação foi efetuada segundo o Kit Enzimático da Lactose (Megazyme). O kit é composto por vários compostos nomeadamente por: tampões, NAD⁺ e diferentes soluções de β -Galactosidase, os quais foram preparados conforme as indicações descritas no kit.

O procedimento seguido foi o seguinte, resumidamente: foi pesado 1 g de amostra (iogurte controlo e iogurte com algas) para um balão volumétrico, tendo sido adicionados 60 ml de água destilada. De seguida os balões foram colocados em banho-maria (SW22, Julabo) a 50°C, durante 15 minutos, agitando ocasionalmente. Após este tempo, foram adicionados 2 ml de solução Carrez I (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e 2 ml de solução Carrez II (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), agitou-se e foram acrescentados mais 4 ml de Hidróxido de Sódio (NaOH) (Merck, Alemanha) 100 mM, agitando vigorosamente. Perfez-se o volume com água destilada e foi efetuada a filtração da solução, utilizando para o ensaio apenas o filtrado límpido. Para a realização do ensaio enzimático (branco e amostra), com a utilização de micropipetas, foram introduzidos em cuvettes de plástico 0,200 ml da amostra e 0,200 ml da solução 4 (β -Galactosidade), sendo que o ensaio branco não contém amostra. As cuvettes foram agitadas cuidadosamente, tapadas com parafilme e incubadas a 25°C por 10 minutos. Após este tempo foram adicionados ao ensaio branco: 2,20 ml de água destilada, 0,20 ml de solução 2 (tampão) e 0,10 ml de solução 3 (NAD⁺). Ao ensaio da amostra foram adicionados: 2 ml de água destilada, 0,20

ml de solução 2 (tampão) e 0,10 ml de solução 3 (NAD⁺). Após a adição destes compostos as cuvettes foram novamente agitadas e foi lida a absorvância das mesmas a um comprimento de onda de 340 nm, sendo que depois foi iniciada a reação pela adição de 0,02 ml da suspensão 5 (β -Galactosidase desidrogenase e Galactose mutarotase) a cada uma das cuvettes, incluindo o branco. As cuvettes foram mais uma vez agitadas e foi novamente lida a absorvância (340 nm) das soluções no final da reação, que deve ser inferior a 5 minutos, até que o valor de absorvância seja o mesmo entre os intervalos.

3.2.5 Determinação do Teor de Fibras

Esta determinação foi efetuada de acordo com o Kit de Ensaio para Fibra Alimentar Total (TDF-100A, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), que inclui α -amilase, protease, amiloglicosidase e celite.

A amostra a utilizar para a determinação das fibras, segundo este método, deve estar devidamente liofilizada, através do uso de um liofilizador (Scanvac, Coolsafe). Antes de liofilizar, a amostra deve estar previamente congelada a -80°C num ultracongelador (Forma-86C Ult Freezer, Thermo Electron Corporation).

O procedimento seguido foi o seguinte, resumidamente: para a degradação enzimática foi pesado 1 g de amostra para um gobelé de 400 ml, tendo sido adicionados 40 ml de tampão MES/TRIS (Merck, Alemanha) e ajustado o pH a 8,3 com solução Hidróxido de Sódio (NaOH) a 5%. O gobelé foi colocado em banho-maria (SW22, Julabo) a uma temperatura de 95-100°C, com agitação e tapado com vidro de relógio. De seguida foram acrescentados 50 μ l de α -amilase, permanecendo em incubação por 30 minutos a 95-100°C, tendo após este tempo sido reduzida a temperatura para 60°C. Quando atingida esta temperatura, foram adicionados 50 μ l de protease ficando em incubação por mais 30 minutos. Passado este tempo foram acrescentados 5 ml de HCl a 0,56 mol/l e foi ajustado o pH para 4-4,7, com utilização de NaOH/HCl a 5%. Por fim foram adicionados 150 μ l de amiloglicosidase e permaneceu em incubação por mais 30 minutos. Foi efetuado o mesmo procedimento para o ensaio branco que não continha amostra. Para a determinação da fibra total foram aquecidos 220 ml de etanol a 95% (aga, Portugal) até 60°C, os quais foram adicionados a cada um dos gobelés (amostra e branco). Precipitou-se a solução à temperatura ambiente cerca de 1h, tendo posteriormente a solução sido decantada e filtrada num cadinho de goosh devidamente preparado (anexo 7.1.4, figura 7.1.9).

Para a preparação dos cadinhos, estes foram aquecidos durante 1h a 525⁰C na mufla (Controller B170, Nabertherm), foi depois adicionado 1 g de celite 545 (Fisher Scientific, Inglaterra) e voltou-se a incinerar a 525⁰C durante a noite, tendo sido arrefecido e armazenado em exsiccador. De seguida os cadinhos foram secados durante a noite a 105⁰C, arrefeceu-se em exsiccador e procedeu-se à pesagem com erro máximo de 0,1 mg.

Após a filtração, os restos presentes no gobelé foram lavados com etanol a 78% (Panreac, Espanha), etanol a 95% e acetona (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Os cadinhos foram colocados na estufa (WTB 7200, Binder) a 105⁰C durante a noite, arrefecidos e pesados com erro máximo de 0,1 mg.

De seguida foi necessário determinar a percentagem de proteína pela técnica do Kjeldahl do resíduo seco, assim como determinar as cinzas do resíduo a 525⁰C durante 5h na mufla.

3.2.6 Determinação da Cinza Total

A cinza total foi determinada através do resíduo por incineração, com base na Norma Portuguesa 477 de 1983 (anexo 7.5), com algumas alterações. O resíduo final é obtido por aquecimento do produto pretendido a uma temperatura entre 500-550⁰C.

Para a determinação da cinza total, procedeu-se da seguinte forma: foram pesados cerca de 5 g de amostra para um cadinho de porcelana, previamente seco e pesado. Os cadinhos foram colocados na mufla (Controller B170, Nabertherm) (anexo 7.1.5, figura 7.1.10) a uma temperatura de 500⁰C durante 5 horas. Deixou-se arrefecer em exsiccador e procedeu-se à pesagem.

3.2.7 Determinação do Teor de Humidade

Para a determinação do teor de humidade por gravimetria, com base na Norma Portuguesa 875 de 1994, procedeu-se da seguinte forma: foram pesados cerca de 2 g de amostra para um cadinho de porcelana, previamente seco e pesado. Os cadinhos foram colocados na estufa (WTB 7200, Binder) a uma temperatura de 105⁰C durante aproximadamente 8 horas. Deixou-se arrefecer em exsiccador e procedeu-se à pesagem.

3.2.8 Determinação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada através da técnica do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), a partir da adaptação do método descrito por Duan e colaboradores (2006). Para a realização desta técnica foram previamente feitos os extratos a partir da amostra liofilizada, recorrendo ao uso de um liofilizador (Scanvac, Coolsafe), com prévia ultracongelação a -80°C num ultracongelador (Forma-86C Ult Freezer, Thermo Electron Corporation) (anexo 7.1.6, figura 7.1.11). Foi colocado num falcon 1 g de amostra liofilizada para 8 ml de água destilada, sendo o falcon agitado em vortex (Velpr Científica) por 30 minutos, com posterior centrifugação (Centrifuge 5804R, Eppendorf) a 5000 rpm por 10 minutos, seguido de uma filtração com filtro N^o4. Este processo foi repetido sempre 2 vezes para garantir o máximo aproveitamento da amostra. O líquido resultante da filtração foi novamente liofilizado e posteriormente dissolvido a uma concentração conhecida em água destilada para utilização na determinação da atividade antioxidante em ambos os métodos. Não foi utilizado DMSO devido ao facto de dificultar o processo de dissolução da amostra liofilizada.

O método do DPPH baseia-se na captura do radical livre DPPH por antioxidantes, produzindo uma diminuição da coloração da solução. Foram preparados 2 mg de DPPH (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) em 50 ml de etanol (Panreac, Espanha) num falcon protegido da luz, tendo sido agitado em vortex e colocado nos ultrassons (VWR Prolabo Chemicals, Bélgica) até à sua completa dissolução. De seguida foi lida a sua absorvância no espectrofotómetro UV-VIS (Helios α , Thermo Electron Corporation) com comprimento de onda de 517 nm e confirmado se o valor obtido estava acima de 1. Caso esteja abaixo de 1 tem que se colocar novamente nos ultrassons. Como controlo, foi colocado num eppendorf protegido da luz 10 μl de água destilada e 990 μl de DPPH, tendo sido posteriormente a solução homogeneizada através de um vortex e foi deixado reagir durante 30 minutos. Depois foi colocado num eppendorf protegido da luz 10 μl de amostra e 990 μl de DPPH, tendo-se procedido como anteriormente. Como branco foi preparado novamente outro eppendorf protegido da luz com 10 μl de amostra e 990 μl de etanol, tendo-se procedido de forma igual. A absorvância foi lida a um comprimento de onda de 517 nm. Foram utilizados duplicados para a realização deste método.

3.2.9 Determinação do pH

Esta determinação foi realizada utilizando um potenciómetro (WTW, inoLab pH 720), com prévia calibração do aparelho de medição e foram registadas três leituras de

cada amostra de modo a obter resultados mais rigorosos.

3.2.10 Determinação da Cor

Esta determinação foi realizada utilizando um colorímetro (Chroma Meter CR-400, Konic Minolta) previamente calibrado e foram registadas três leituras de cada amostra de modo a obter resultados mais coerentes.

3.3 Análises Microbiológicas

Durante todas as análises microbiológicas efetuadas, todo o material utilizado, assim como o espaço de trabalho estava devidamente esterilizado, para evitar contaminações e alterações nos resultados. O material foi esterilizado em autoclave (Steam Sterilizer, Raypa). Foram sempre efetuados duplicados por diluição e preparadas placas controlo sem amostra para verificar a esterilidade do meio. Todas as pesagens necessárias foram efetuadas em balança analítica (Explorer Pro- EP213, OHAUS).

3.3.1 Microrganismos Totais (Aeróbios e Anaeróbios) a 20°C

A contagem de microrganismos totais foi baseada na EN ISO 4833:2003 (anexo 7.6), que foi atualizada e substituída para EN ISSO 48 que é um método por incorporação.

O procedimento seguido foi o seguinte, de forma resumida: inicialmente foi preparada a solução mãe (s.-mãe) onde foram pesados 25 g de amostra e posteriormente dissolvidos em 225 ml de triptona sal (Maximum Recovery Diluent, Oxoid, Inglaterra). O saco foi homogeneizado num Stomacher (BagMixer 400P, Interscience). De seguida foram transferidos 2 ml da s.-mãe para um tubo de ensaio que continha 18 ml de diluente (triptona sal), tendo este sido depois homogeneizado. Procedeu-se às seguintes diluições por ordem decrescente desde a diluição -9 à -1. Por incorporação, numa placa de petri esterilizada foi colocado 1 ml da s.-mãe, tendo esta operação sido sucessivamente repetida, com as diluições seguintes. Foi misturado cuidadosamente ao inóculo Plate Count Agar (PCA, Oxoid, Inglaterra) derretido e suplementado com L-cisteína (Scharlau, Espanha), de modo a obter uma repartição homogénea dos microrganismos. As placas foram deixadas a solidificar e incubadas de seguida a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $72 \pm 6\text{h}$ em estufa (Hot line, Binder), sendo que no caso dos microrganismos anaeróbios, as placas foram colocadas num jarro de anaerobiose com Anaerocult A (Merck, Alemanha) e Anaerotest (Merck,

Alemanha) para criação do meio anaeróbio. Após este tempo foi efetuada e registada a contagem das colónias em cada placa de petri de 2 diluições sucessivas que apresentem entre 15 e no máximo 300 colónias. Esta contagem foi efetuada recorrendo a um contador de unidades formadoras de colónias (Colony Counter SC6, Stuart).

3.3.2 *Escherichia coli* (*E.coli*)

A contagem de *E. coli* foi baseada na EN ISO 6887-4:2003, que é um método por incorporação.

O procedimento seguido foi o seguinte, de forma resumida: inicialmente foi preparada a solução mãe (s.-mãe) onde foram pesados 25 g de amostra e posteriormente dissolvidos em 225 ml de triptona sal (Maximum Recovery Diluent, Oxoid, Inglaterra). O saco foi homogeneizado num Stomacher (BagMixer 400P, Interscience). De seguida foram transferidos 2 ml da s.-mãe para um tubo de ensaio que continha 18 ml de diluente (triptona sal), tendo este sido depois homogeneizado. Procedeu-se às seguintes diluições por ordem decrescente desde a diluição -9 à -1. Por incorporação, numa placa de petri esterilizada foi colocado 1 ml da s.-mãe, tendo esta operação sido sucessivamente repetida, com as diluições seguintes. Foi misturado cuidadosamente ao inóculo Tryptone Bile X-glucuronide Agar (TBX, Scharlau, Espanha) derretido, de modo a obter uma repartição homogénea dos microrganismos. As placas foram deixadas a solidificar e incubadas de seguida a 37°C ± 1°C durante 4h em estufa (Hot line, Binder), tendo as placas sido posteriormente transferidas para estufa a 44°C ± 1°C durante 24h aerobicamente. Após este tempo foi efetuada e registada a contagem das colónias azuis claras ou escuras ou azul-esverdeadas em cada placa de petri de 2 diluições sucessivas que apresentem entre 15 e no máximo 300 colónias (típicas e não típicas). Esta contagem foi efetuada recorrendo a um contador de unidades formadoras de colónias (Colony Counter SC6, Stuart). Pelo menos 1 placa tem que conter 15 colónias azuis para utilização do caso geral.

3.3.3 Enterobactérias

A contagem de Enterobactérias foi baseada na EN ISO 21528-2:2004, que é um método por incorporação.

O procedimento seguido foi o seguinte, de forma resumida: inicialmente foi preparada a solução mãe (s.-mãe) onde foram pesados 25 g de amostra e posteriormente dissolvidos em 225 ml de triptona sal (Maximum Recovery Diluent, Oxoid, Inglaterra). O saco foi homogeneizado num Stomacher (BagMixer 400P, Interscience). De seguida foram transferidos 2 ml da s.-mãe para um tubo de ensaio que continha 18 ml de diluente (triptona sal), tendo este sido depois homogeneizado. Procedeu-se às seguintes diluições por ordem decrescente desde a diluição -9 à -1. Por incorporação, numa placa de petri esterilizada foi colocado 1 ml da s.-mãe, tendo esta operação sido sucessivamente repetida, com as diluições seguintes. Foi misturado cuidadosamente ao inóculo Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Oxoid, Inglaterra) derretido, de modo a obter uma repartição homogénea dos microrganismos. As placas foram deixadas a solidificar e incubadas de seguida a 37°C durante 24 ± 2h em estufa (Hot line, Binder), aerobicamente. Após este tempo foi efetuada e registada a contagem das colónias de coloração rosa a vermelho-púrpura (com ou sem halo de precipitação) em cada placa de petri de 2 diluições sucessivas que apresentem entre 15 e no máximo 150 colónias, seguida da confirmação das mesmas. Esta contagem foi efetuada recorrendo a um contador de unidades formadoras de colónias (Colony Counter SC6, Stuart). Para confirmação, foram isoladas 5 colónias características por placa. Se a placa tiver menos que 5 colónias, são testadas as que existirem. As colónias selecionadas foram inoculadas em Nutrient Agar (NA, VWR Prolabo Chemicals, Bélgica) para purificação e as placas foram incubadas a 37°C durante 24 ± 2h em estufa, aerobicamente. Após este tempo foi efetuado o teste da oxidase e inoculados os tubos com colónias oxidase negativas em caldo Dextrose BCP, sendo novamente incubados a 37°C durante 24 ± 2h.

3.3.4 *Salmonella*

A pesquisa de *Salmonella* foi efetuada com base na EN ISO 16140:2003, pela técnica VIDAS.

O procedimento seguido foi o seguinte, de forma resumida: inicialmente foi preparada a fase de pré-enriquecimento onde foram pesados 25 g de amostra, posteriormente dissolvidos em 225 ml de água peptonada tamponada (buffered peptone water, Oxoid, Inglaterra). O saco foi homogeneizado num Stomacher (BagMixer 400P, Interscience) e incubado a 37°C ± 1°C durante 24-26h em estufa (Hot line, Binder), aerobicamente. Segue-se a fase de enriquecimento, na qual foram transferidos 0,5 ml da suspensão para um tubo com 10 ml de caldo *Salmonella*

Express (SX), sendo este incubado a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24-26h. Após este tempo, o caldo SX foi homogeneizado e foi transferido 1-2 ml deste para um tubo vazio. Este tubo foi fechado hermeticamente e colocado em banho-maria a 95°C - 100°C e deixado a ferver durante 15 ± 1 min. Depois foi deixado arrefecer e foi efetuado o teste VIDAS.

Após obter o resultado proveniente do equipamento mini-VIDAS (Biomerieux, Estados Unidos), o valor pode dar presença ou ausência de *Salmonella* em 25 g de produto. No caso positivo, é necessário efetuar a confirmação, sendo repicado em XLD e SMID 2 e incubado a 37°C durante 24h. Se for negativo, a incubação é prolongada mais 24h a 37°C e são transferidos 0,5 ml do caldo SX para 10 ml de RVS e incubado a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18-24h. De seguida é efetuado o isolamento do caldo RVS para XLD e SMID2 a 37°C durante 24-48h. Depois é recuperado e purificado em Nutrient Agar (NA, VWR Prolabo Chemicals, Bélgica) e tubos kliger 1 colónia típica e/ou suspeita. Se a confirmação for negativa são depois isoladas até 4 colónias por meio e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 h. Por fim são realizados os testes Gram e oxidase, onde é utilizado API 20 E para confirmação.

3.3.5 *Listéria monocytogenes* (*L. monocytogenes*)

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi baseada na EN ISO 11290-2:1998 (anexo 7.7), que é um método por incorporação.

O procedimento seguido foi o seguinte, de forma resumida: inicialmente foi preparada a solução mãe (s.-mãe) onde foram pesados 25 g de amostra e posteriormente dissolvidos em 225 ml de água peptonada tamponada (buffered peptone water, Oxoid, Inglaterra). O saco foi homogeneizado num Stomacher (BagMixer 400P, Interscience). De seguida foi transferido 1 ml da s.-mãe para um tubo de ensaio que continha 9 ml de diluente (água peptonada tamponada), tendo este sido depois homogeneizado. Procedeu-se às seguintes diluições por ordem decrescente desde a diluição -9 à -1 . Por incorporação, numa placa de petri esterilizada foi colocado 1 ml da s.-mãe, tendo esta operação sido sucessivamente repetida, com as diluições seguintes. Foi misturado cuidadosamente ao inóculo o meio RAPID'L.mono (Bio-Rad, Estados Unidos), de modo a obtendo uma repartição homogénea dos microrganismos. As placas foram deixadas a solidificar e incubadas de seguida a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48h em estufa (Hot line, Binder), aerobicamente. Após este tempo foi efetuada e registada a contagem das colónias de coloração verde com depressão central e

rodeadas por halos pretos, em cada placa de petri de 2 diluições sucessivas (quando possível) que apresentem no máximo 150 colónias, seguida da confirmação das mesmas. Esta contagem foi efetuada recorrendo a um contador de unidades formadoras de colónias (Colony Counter SC6, Stuart). Para confirmação, foram isoladas 5 colónias por cada placa que continha até 150 colónias. Se a placa tiver menos que 5 colónias, são testadas as que existirem. As colónias selecionadas foram inoculadas em Tryptone Soya Yeast Extract (TSYEA) e as placas foram incubadas entre 35^oC a 37^oC durante 18-24h em estufa, aerobicamente. Após este tempo foi efetuada a reação catálase, onde é retirada uma colónia da placa com TSYEA e suspensa numa solução de peróxido de hidrogénio, sendo que a formação imediata de bolhas de gás indica uma reação positiva. Caso este teste dê uma reação positiva indicativa que está presente *Listéria*, deve-se efetuar outros testes para confirmação da espécie caso seja *L. monocytogenes*.

3.3.6 *Lactobacillus* sp.

A pesquisa de *Lactobacillus* sp. foi efetuada com base no artigo “Microbiological and rheological studies on portuguese kefir grains” (Pintado, M., et al., 1996).

O procedimento seguido foi o seguinte, de forma resumida: inicialmente foi preparada a solução mãe (s.-mãe) onde foram pesados 25 g de amostra, que foram posteriormente dissolvidos em 225 ml de Cloreto de Sódio (NaCl) (Merck, Espanha), com uma concentração de 0,85%. O saco foi homogeneizado num Stomacher (BagMixer 400P, Interscience). De seguida foi transferido 1 ml da s.-mãe para um tubo de ensaio que continha 9 ml de diluente (NaCl) a 0,85%, tendo este sido depois homogeneizado. Procedeu-se às seguintes diluições por ordem decrescente desde a diluição -9 à -1. Por incorporação, numa placa de petri esterilizada foi colocado 1 ml da s.-mãe, tendo esta operação sido sucessivamente repetida, com as diluições seguintes. Foi misturado cuidadosamente ao inóculo MRS Agar (MRS, Scharlau, Espanha) derretido e suplementado com solução de ciclohexamida a 0,5% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), de modo a obter uma repartição homogénea dos microrganismos. As placas foram deixadas a solidificar e incubadas de seguida a 30^oC durante 5 dias em estufa (Hot line, Binder), anaerobicamente. Para criação da condição anaeróbia, as placas foram colocadas num jarro de anaerobiose com Anaerocult A (Merck, Alemanha) e Anaerotest (Merck, Alemanha). Após este tempo foi efetuada e registada a contagem das colónias em cada placa de petri de 2 diluições sucessivas. Esta contagem foi efetuada recorrendo a um contador de unidades formadoras de

colónias (Colony Counter SC6, Stuart).

3.3.7 *Streptococcus*

A pesquisa de *Streptococcus* foi efetuada com base no artigo “Microbiological and rheological studies on portuguese kefir grains” (Pintado, M., et al., 1996).

O procedimento seguido foi o seguinte, de forma resumida: inicialmente foi preparada a solução mãe (s.-mãe) onde foram pesados 25 g de amostra, que foram posteriormente dissolvidos em 225 ml de Cloreto de Sódio (NaCl) (Merck, Espanha), com uma concentração de 0,85%. O saco foi homogeneizado num Stomacher (BagMixer 400P, Interscience). De seguida foi transferido 1 ml da s.-mãe para um tubo de ensaio que continha 9 ml de diluente (NaCl) a 0,85%, tendo este sido depois homogeneizado. Procedeu-se às seguintes diluições por ordem decrescente desde a diluição -9 à -1. Por incorporação, numa placa de petri esterilizada foi colocado 1 ml da s.-mãe, tendo esta operação sido sucessivamente repetida, com as diluições seguintes. Foi misturado cuidadosamente ao inóculo M17 Agar (M17, Merck, Alemanha) derretido e suplementado com solução de ciclohexamida a 0,5% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), de modo a obter uma repartição homogénea dos microrganismos. As placas foram deixadas a solidificar e incubadas de seguida a 30^oC durante 48h em estufa (Hot line, Binder), aerobicamente. Após este tempo foi efetuada e registada a contagem das colónias em cada placa de petri de 2 diluições sucessivas. Esta contagem foi efetuada recorrendo a um contador de unidades formadoras de colónias (Colony Counter SC6, Stuart).

3.4 Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada através de várias provas, de aceitação, afetiva e triangular, tendo sido efetuadas diferentes folhas de prova, de acordo com a evolução da preferência do iogurte, até chegar à formulação final.

No primeiro caso, em que o iogurte foi formulado com leite meio gordo, a prova foi realizada com entre 8 a 9 provadores e foi-lhes pedido que provassem inicialmente 8 amostras codificadas, tendo este número sido reduzido para 3 amostras codificadas. Os tabuleiros distribuídos continham os frascos com amostra devidamente codificados, número de colheres correspondente ao número de amostras, um copo com água e um guardanapo. As 8 amostras iniciais referiam-se a 4 formulações diferentes de iogurte, sendo que 4 foram fermentados em banho-maria e as outras 4 na iogurteira. Na prova

sensorial final com iogurte formulado com leite meio gordo foram testadas 3 formulações diferentes de iogurte, onde variava o tipo de iogurte natural (iogurte natural e/ou iogurte grego natural), e o tipo (açúcar branco e/ou açúcar amarelo) e quantidade de açúcar (50 g e/ou 80 g). Na folha de prova (anexo 7.8) apresentada aos provadores foi-lhes pedido que provassem as amostras fornecidas e que, numa escala de avaliação de aceitabilidade de 1 a 9 (em que 1 correspondia a “extremamente desagradável” e 9 correspondia a “extremamente agradável”) e numa escala de avaliação de intensidade de 1 a 9 (em que 1 correspondia a “pouco intenso” e 9 correspondia a “extremamente intenso”), as caracterizassem de acordo com sete parâmetros, particularmente o odor, a cor, o doce, o ácido, a textura, o sabor a produtos do mar e o flavour residual/persistência de sabor. No final, colocou-se uma questão de qual das amostras o provador preferia.

No caso do iogurte formulado com leite sem lactose, a prova foi inicialmente realizada entre 7 e 9 provadores e foi-lhes pedido que provassem inicialmente 2 amostras codificadas, tendo no final sido testadas 3 amostras codificadas. Os tabuleiros distribuídos continham os frascos com amostra devidamente codificados, número de colheres correspondente ao número de amostras, um copo com água e um guardanapo. As 2 amostras iniciais referiam-se a 2 formulações diferentes de iogurte, onde variava a quantidade de leite sem lactose (900 ml e/ou 1000 ml) e de açúcar (20 g e/ou 40 g). A partir das 2 amostras avaliadas, foi efetuada uma prova sensorial de aceitação final, onde a única diferença era o tipo de espessante utilizado, entre farinha de tapioca, amido de milho e agar. Na folha de prova (anexo 7.9) apresentada aos provadores foi-lhes pedido que provassem as amostras fornecidas e que, numa escala de avaliação de aceitabilidade de 1 a 9 (em que 1 correspondia a “extremamente desagradável” e 9 correspondia a “extremamente agradável”) e numa escala de avaliação de intensidade de 1 a 9 (em que 1 correspondia a “pouco intenso” e 9 correspondia a “extremamente intenso”), as caracterizassem de acordo com sete parâmetros, particularmente o odor, a cor, o doce, o ácido, a textura, o sabor a produtos do mar e o flavour residual/persistência de sabor. No final, colocou-se uma questão de qual das amostras o provador preferia.

No caso da prova afetiva, esta foi realizada com apenas duas amostras codificadas, uma era com iogurte formulado com leite meio gordo e outra com leite sem lactose, ambas as preferidas anteriormente pelos provadores. O objetivo desta prova foi avaliar a preferência dos provadores em relação aos 2 iogurtes diferentes, sem os

mesmos saberem qual dos iogurtes continha ou não lactose. Esta prova foi realizada com 50 provadores de ambos os géneros e com idades compreendidas entre os 18 e os 62 anos. Os tabuleiros distribuídos continham os frascos com amostra devidamente codificados, 2 colheres, um copo com água e um guardanapo (anexo 7.1.8, figura 7.1.13). Na folha de prova (anexo 7.10) encontravam-se os códigos das amostras e era pedido que os provadores escolhessem a amostra mais agradável. Por fim, pediu-se que indicassem duas razões (atributos) que influenciaram a sua escolha.

No caso da prova triangular, esta foi realizada com três amostras codificadas, sendo que duas eram iguais e apenas uma era diferente, mas todas apresentavam códigos diferentes. Todas as amostras foram formuladas de igual forma mas com tempos de fabricação diferentes (0 e 30 dias). O objetivo desta prova foi avaliar se os provadores conseguiam notar diferença no sabor entre um iogurte produzido no momento e um iogurte produzido há 1 mês, sem os mesmos saberem qual a diferença entre os 3 iogurtes. Esta prova foi realizada com 16 provadores de ambos os géneros. Os tabuleiros distribuídos continham os frascos com amostra devidamente codificados, 3 colheres, um copo com água e um guardanapo. Na folha de prova (anexo 7.11) encontravam-se três questões, código da amostra diferente e qual a amostra preferida. Por fim, pediu-se que indicassem a razão da escolha pela sua preferência.

4. Discussão de Resultados

4.1 Análises Físico-Químicas

Os resultados obtidos nas diferentes análises físico-químicas realizadas encontram-se discriminados na tabela 4.1 em baixo apresentada.

Tabela 4.1 - Resultados obtidos nas diferentes análises químicas, onde logurte Ct1, Ct2 e Ct3 correspondem às três repetições para cada amostra controlo, logurte Ct_0, Ct_15 e Ct_30 correspondem às médias das três repetições, logurte A1, A2 e A3 correspondem às três repetições para cada amostra com alga, logurte A_0, A_15 e A_30 correspondem às médias das três repetições e, por fim, DP corresponde ao desvio padrão associado a cada média, respetivamente.

		Parâmetros Analisados												
T (dias)	Amostra	Proteína (%)	Matéria Gorda (%)	Acidez (ml/l)	Lactose (%)	Fibras (%)	Cinzas (%)	Humidade (%)	Hidratos de Carbono (%)	Valor Energético (kcal)	Redução DPPH (%)	pH	Cor (ΔE)	
0	logurte Ct1	3,37	2,50	95	0,22	2,17	0,68	83,97	9,38	73,50	2,38	4,34	31,26	
	logurte Ct2	3,30	2,99	94		2,18	0,71	84,14	8,92	75,80	4,61	4,37		
	logurte Ct3													4,38
	logurte Ct_0	3,34	2,75	94,5		2,18	0,69	84,06	9,15	74,65	3,49	4,36		
	DP	0,05	0,35	0,71	0,01	0,02	0,12	0,32	1,63	1,58	0,02			
	logurte A1	3,61	1,63	81	0,41	2,90	0,73	83,30	10,62	71,59	2,71	4,41		
	logurte A2	3,77	1,58	81		2,9	0,71	83,46	10,49	71,26	4,11	4,41		
	logurte A3													4,43
	logurte A_0	3,69	1,61	81		2,90	0,72	83,38	10,56	71,43	3,41	4,42		
	DP	0,11	0,04	0,00		0,00	0,01	0,11	0,09	0,23	0,99	0,01		
15	logurte Ct1			91								4,33		
	logurte Ct2			90								4,34		
	logurte Ct3											4,34		
	logurte			90,5								4,34		

	Ct_15													
	DP			0,71								0,01		
	logurte A1			88								4,34		
	logurte A2			89								4,34		
	logurte A3											4,34		
	logurte A_15			88,5								4,34		
	DP			0,71								0		
30	logurte Ct1	3,43	2,60	95	0,30		0,73	84,47	8,78	72,23	4,94	4,31	34,88	
	logurte Ct2	3,35	2,92	93				0,75	84,54	8,55	73,88	4,70		4,33
	logurte Ct3													4,34
	logurte Ct_30	3,39	2,76	94				0,74	84,51	8,66	73,05	4,82		4,33
	DP	0,06	0,23	1,41			0,01	0,05	0,16	1,16	0,17	0,02		
	logurte A1	3,65	1,58	85	0,44		0,78	83,80	10,19	69,58	2,51	4,33		
	logurte A2	3,82	1,65	83				0,78	83,77	9,98	70,03	2,60		4,34
	logurte A3													4,33
	logurte A_30	3,74	1,62	84				0,78	83,79	10,08	69,81	2,55		4,33
	DP	0,12	0,05	1,41				0,00	0,02	0,15	0,32	0,06		0,01

4.1.1 Tratamento Estatístico

Com o objetivo de averiguar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as amostras (logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30, logurte A_30), para os parâmetros em análise (Proteína (%), Matéria Gorda (%), Acidez (ml/l), Lactose (%), Cinzas (%), Humidade (%), Hidratos de Carbono (%), Valor Energético (kcal), Redução de DPPH (%), pH e Cor) foi realizada uma ANOVA (anexo 7.12, tabela 7.12.4 e tabela 7.12.9) ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (anexo 7.12, tabela 7.12.2 e tabela 7.12.7), dependendo da violação ou não dos pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias (anexo 7.12, tabela 7.12.1 e tabela 7.12.6). Sempre que os resultados foram estatisticamente significativos, as respetivas comparações múltiplas foram realizadas (anexo 7.12, tabela 7.12.3, tabela 7.12.5 e tabela 7.12.8). Foram efetuados os testes estatísticos com base em dois fatores diferentes: o tipo de iogurte e o tempo de produção. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados através do software IBM SPSS Statistics 21.0. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância (α) de 0,05.

Com o objetivo de determinar as componentes principais que expliquem o máximo possível da variação total dos dados com o menor número possível de componentes, foi efetuado o teste estatístico PCA. De referir que todos os pressupostos inerentes à realização do PCA foram analisados, nomeadamente a prévia realização de um DCA, onde foi observado o valor de “length of gradient”, de modo a perceber se as variáveis respondem aproximadamente de forma linear aos gradientes (Anexo 7.12, figura 7.12 e figura 7.12.1).

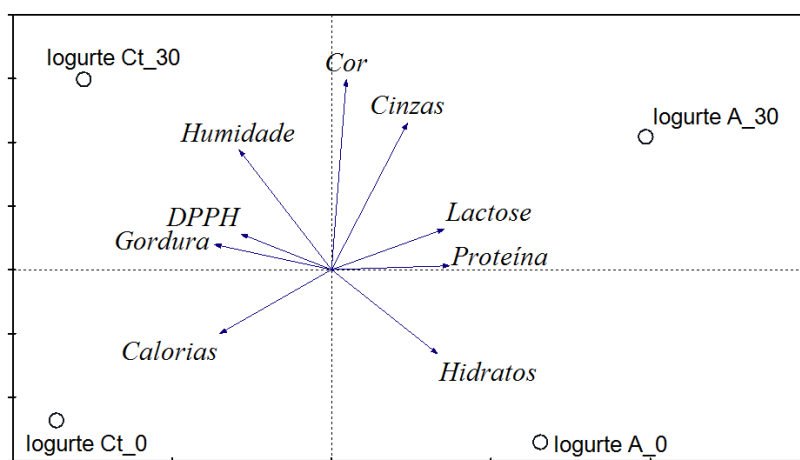


Figura 4.1 - Representação gráfica (CanoDraw) do PCA com base nos parâmetros físico-químicos (Proteína, Matéria Gorda, Lactose, Cinzas, Humidade, Hidratos de Carbono, Valor Energético, Redução de DPPH e Cor), em relação às diferentes amostras e respetivos tempos (logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30).

Através da observação do gráfico acima representado foi possível constatar que em relação à Proteína, a amostra que apresenta maior teor proteico é logurte A_30 e a que apresenta menor teor proteico é logurte Ct_0, com pouca diferença de logurte Ct_30. Relativamente à Matéria Gorda (Gordura), a amostra com valor de Matéria Gorda mais elevada é logurte Ct_30 e a que apresenta menor matéria gorda é logurte A_0. Em relação à Lactose, a amostra logurte A_30 apresenta um maior conteúdo em Lactose e logurte Ct_0 apresenta menor conteúdo. Para o parâmetro Cinzas, a amostra logurte A_30 tem maior conteúdo de cinzas e logurte Ct_0 tem menor conteúdo de cinzas. Relativamente à Humidade, a amostra logurte Ct_30 tem a percentage de Humidade mais elevada, sendo que logurte A_0 tem a percentage menor. No caso dos Hidratos de Carbono, a amostra logurte A_0 apresenta o valor mais elevado e logurte Ct_30 apresenta o menor valor. Em relação ao Valor Energético (Calorias), a amostra logurte Ct_30 tem um valor mais elevado, enquanto logurte A_30 tem o valor menor. No caso da capacidade de redução do DPPH, a amostra logurte Ct_30 apresenta o maior valor, enquanto logurte A_30 apresenta o menor valor. Por fim, no caso da Cor, ambas as amostras ao dia 30 (logurte Ct_30 e logurte A_30) têm um valor mais elevado, enquanto ambas as amostras ao dia 0 (logurte Ct_0 e logurte A_0) têm um valor mais reduzido.

Em relação ao tipo de relações existentes entre os parâmetros físico-químicos, é possível indicar como tendo uma relação inversa: Proteína e DPPH, Proteína e Gordura, Proteína e Calorias, Proteína e Humidade, Hidratos e DPPH, Hidratos e Gordura, Hidratos e Humidade, Hidratos e Cor, Calorias e Cinzas, Calorias e Lactose, Calorias e Cor, Gordura e Lactose, Gordura e Cinzas, DPPH e Lactose. A relação inversa é caracterizada pela existência de um ângulo superior a 90° entre os parâmetros, sendo que quando um aumenta o outro diminui. Em termos de relações nulas é possível indicar: Calorias e Humidade, DPPH e Cinzas, Humidade e Lactose. A relação nula é caracterizada pela existência de um ângulo de 90° entre os parâmetros, sendo que não existe qualquer relação entre os mesmos. Quando o ângulo existente entre os parâmetros é inferior a 90° , significa que existe realmente correlação entre os mesmos, sendo que quando um aumento o outro também aumenta. Este tipo de correlação ocorre entre: Proteína e Lactose, Hidratos e Proteína, DPPH e Gordura, Calorias e Gordura, Humidade e DPPH, Cor e Humidade, Cinzas e Cor, Lactose Cinzas. Quanto menor o ângulo, maior a correlação.

O tratamento estatístico relativo aos parâmetros físico-químicos acidez e pH foram realizados em separado por terem em conta mais um tempo (Dia 15). Foi

efetuado novamente o teste PCA, sendo que mais uma vez todos os pressupostos inerentes à realização do PCA foram tidos em conta (Anexo 7.12, figura 7.12.2 e figura 7.12.3).

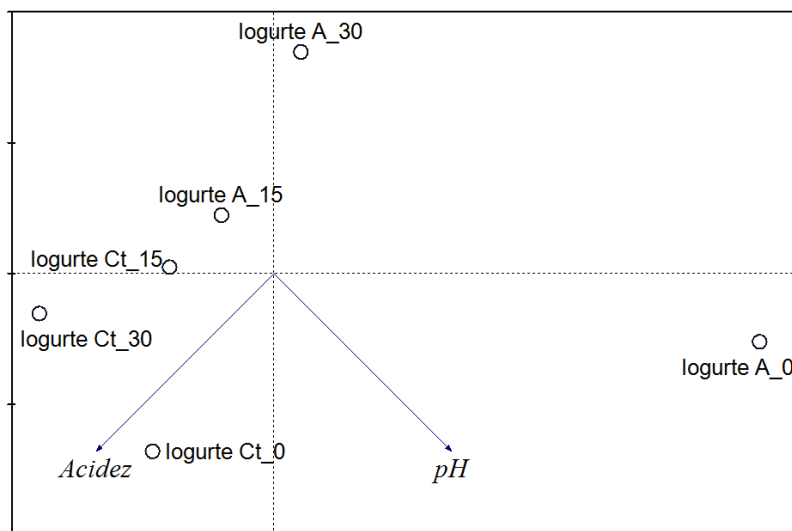


Figura 4.2 - Representação gráfica (CanoDraw) do PCA com base nos parâmetros físico-químicos (Acidez e pH), em relação às diferentes amostras e respectivos tempos (logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30).

Através da observação do gráfico acima representado foi possível constatar que em relação à Acidez, a amostra que apresenta um valor mais elevado é logurte Ct_0 e a que apresenta menor valor é logurte A_0. Relativamente ao pH, a amostra com valor de pH mais elevado é logurte A_0 e a que apresenta pH mais baixo é logurte A_30 e logurte Ct_30.

Em relação ao tipo de relações existentes entre a Acidez e o pH, não é possível indicar a existência de qualquer relação inversa. Em termos de relações nulas é possível indicar: pH e Acidez.

4.1.2 Determinação do Teor de Proteína Bruta

O teor de proteína bruta foi dado pela seguinte fórmula:

$$Proteína (\%) = \frac{0,14 \times (V1 - V0)}{m}$$

Onde:

V0 – Volume da solução de HCl 0,1M gasto na titulação do ensaio em branco (ml);

V1 – Volume da solução de HCl 0,1M gasto na titulação do ensaio com a amostra (ml);

m – massa da toma da amostra (g).

Quando comparadas as 4 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p\text{ value}>0.05$) em nenhum dos fatores avaliados (tipo de iogurte e tempo de produção) (anexo 7.12, tabela 7.12.1 e tabela 7.12.10). De seguida foi efetuada uma ANOVA (anexo 7.12, tabela 7.12.4), a qual indicou a presença de diferenças estatisticamente significativas ($p\text{-value}<0,05$), pelo que se procedeu a um Teste de Comparações Múltiplas (anexo 7.12, figura 7.12.5) recorrendo ao teste de Tukey. Após análise do Teste, foi possível concluir que apenas são detetadas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as amostras de logurte Ct_0 com logurte A_30.

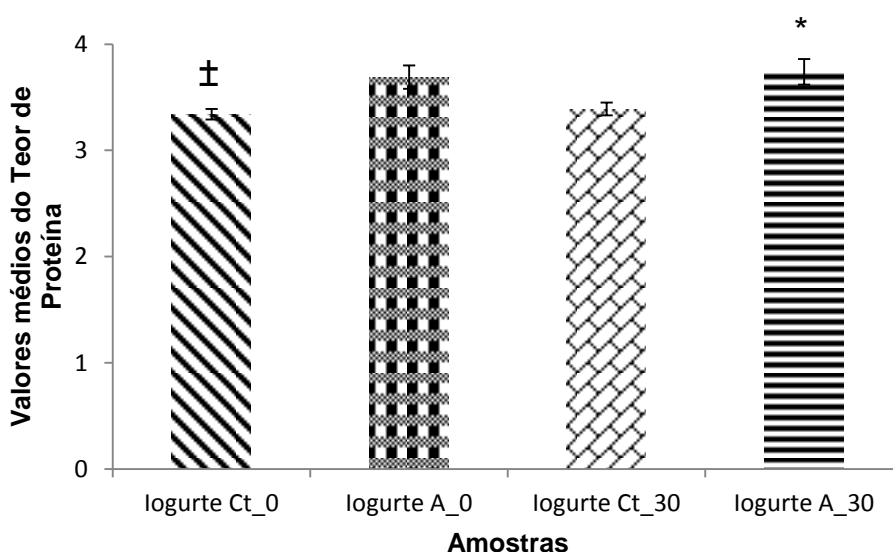


Figura 4.3 - Comparação dos valores médios do teor proteico, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das duas experiências independentes realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de proteína. As linhas verticais representam a média \pm Desvio- Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p<0.05$) quando comparadas as amostras logurte Ct_0 (*) com logurte A_30 (‡).

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte A_30 apresentou um valor médio de teor proteico de 3,74, superior ao logurte A_0 (3,69), ao logurte Ct_30 (3,39) e ao logurte Ct_0 (3,34). Em termos gerais, verificou-se que não ocorreram alterações acentuadas entre os 0 e 30 dias, sendo que a maior diferença detetada foi entre o logurte Ct_0 (3,34) e o logurte A_30 (3,74).

Nas duas repetições da determinação do teor de proteína bruta para cada amostra de iogurte, tabela 4.1, é visível que o logurte produzido com *Spirulina* apresenta um teor proteico mais elevado, apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas.

De acordo com o USDA, um iogurte natural apresenta cerca de 3,47% de proteína, sendo este valor inferior ao apresentado no iogurte produzido com *Spirulina*, mas superior ao iogurte Controlo, evidenciando mais uma vez o elevado teor proteico da alga adicionada.

4.1.3 Determinação do Teor de Matéria Gorda

O teor de matéria gorda foi dado pela seguinte fórmula:

$$\text{Mat. gorda (\%)} = \frac{(m \text{ seca} - m \text{ bal\~{a}o})}{m \text{ amostra}} \times 100$$

Onde:

m seca – massa final do balão, com o sedimento retido (g);
m balão – massa final do balão (g);
m amostra – massa da toma da amostra (g).

Quando comparadas as 4 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram a existência de diferenças estatisticamente significativas (Teste de Kruskal-wallis, $\chi^2 = 5,398$, $p\text{-value} < 0.05$), mas apenas num dos fatores avaliados (tipo de iogurte) (anexo 7.12, tabela 7.12.1 e tabela 7.12.10). De seguida foi efetuado um Teste de Comparações Múltiplas (anexo 7.12, figura 7.12.3) recorrendo ao teste de Tukey. Após análise do Teste, foi possível concluir que apenas não são detetadas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as amostras de logurte Ct_0 com logurte Ct_30 e logurte A_0 com logurte A_30.

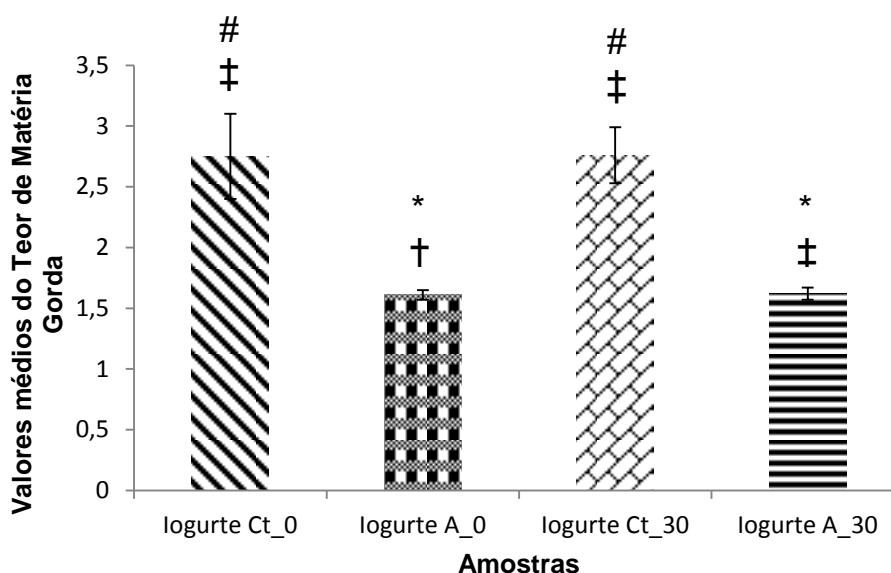


Figura 4.4 - Comparação dos valores médios do teor de matéria gorda, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das duas experiências independentes realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de matéria gorda. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras logurte Ct_0 (*), com logurte A_0 (#), com logurte Ct_30 (†), com logurte A_30 (‡).

Adicionalmente é ainda possível concluir que o iogurte Ct_30 apresentou um valor médio de teor de matéria gorda de 2,76, superior ao iogurte Ct_0 (2,75), ao iogurte A_30 (1,62) e ao iogurte A_0 (1,61). Em termos gerais, verificou-se que praticamente não ocorreram alterações entre os 0 e 30 dias, dentro da mesma categoria de iogurte (Controlo e com *Spirulina*).

Nas duas repetições da determinação do teor de matéria gorda para cada amostra de iogurte, tabela 4.1, é visível que o iogurte produzido com *Spirulina* apresenta um teor de matéria gorda mais reduzido, sendo que efetivamente existem diferenças estatisticamente significativas quando o fator tido em conta foi o tipo de iogurte.

De acordo com o USDA, um iogurte natural apresenta cerca de 3,25% de gordura total, sendo este valor superior a ambos os iogurtes produzidos, com diferença maior entre o iogurte produzido com *Spirulina*, com diferença de 1,6%. A matéria gorda presente no leite passa por muitas alterações bioquímicas durante a produção de iogurte, nomeadamente nos processos de homogeneização e fermentação que resultam na degradação de alguma gordura que passa a ácidos gordos, os quais aumentam a digestão e absorção do iogurte final.

4.1.4 Determinação da Acidez

A acidez foi expressa pela seguinte fórmula:

$$Acidez (ml / l) = 10 \times V$$

Onde:

V – Volume da solução de NaOH 0,1 N gasto na titulação (ml).

Quando comparadas as 6 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram a existência de diferenças estatisticamente significativas (Teste de Kruskal-wallis, $\chi^2 = 1,249$, p-value<0.05) apenas num dos fatores avaliados (tempo de produção) (anexo 7.12, tabela 7.12.6 e tabela 7.12.13). Relativamente ao fator tipo de iogurte, foi efetuada uma ANOVA onde o p-value>0,05, pelo que se conclui que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os 2 tipos de iogurte relativamente ao parâmetro acidez. Em relação ao fator tempo de produção, foi efetuado o Teste de Kruskal-wallis (anexo 7.12, tabela 7.12.14) onde p-value>0,05, pelo que se conclui que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os vários tempos de produção (dia 0, 15 e 30).

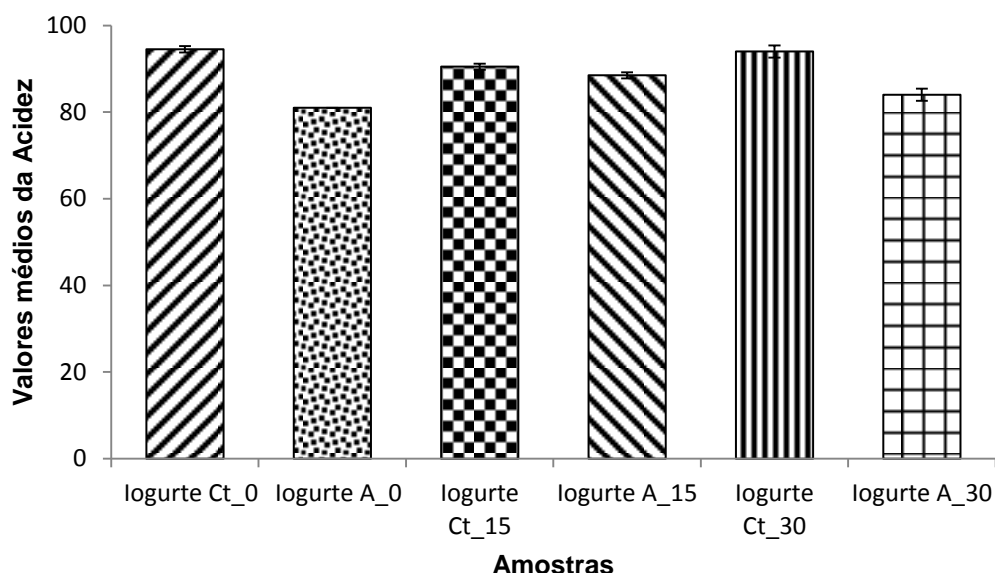


Figura 4.5 - Comparação dos valores médios de Acidez, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das duas experiências independentes realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de acidez. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte Ct_0 apresentou um valor médio de acidez de 94,5, superior ao logurte Ct_30 (94), ao logurte Ct_15 (90,5), ao logurte A_15 (88,5), ao logurte A_30 (84) e ao logurte A_0 (81). Em termos gerais, verificou-se que não ocorreram alterações acentuadas entre os 0 e 30 dias, sendo que a maior diferença foi entre o logurte Ct_0 (94,5) e o logurte A_0 (81).

Nas duas repetições da determinação da acidez para cada amostra de iogurte, tabela 4.1, é visível que o logurte produzido com *Spirulina* apresenta um valor de acidez mais reduzido, apesar de as diferenças estatisticamente significativas detetadas serem com base no tempo de produção (0,15 e 30 dias).

A acidez do iogurte contribui para muitos dos seus efeitos culinários e de saúde. Os ácidos presentes no iogurte é que são responsáveis pelo sabor acentuado. Os compostos ácidos produzidos pelas LAB também contribuem em benefícios para a saúde, sendo que de acordo com o NIH, estes incluem a saúde digestiva e suporte imunitário (Russo, Juniper).

4.1.5 Determinação do Teor de Lactose

Para o cálculo do teor de lactose, foi necessário introduzir os valores obtidos no Excel fornecido pelo website Megazyme e proceder de acordo com as instruções fornecidas.

Quando comparadas as 4 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram a ausência do valor de p-value, pelo que não é possível avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas em qualquer um dos fatores avaliados (anexo 7.12, tabela 7.12.1 e tabela 7.12.10), pela falta de dados suficientes para a aplicação do método estatístico.

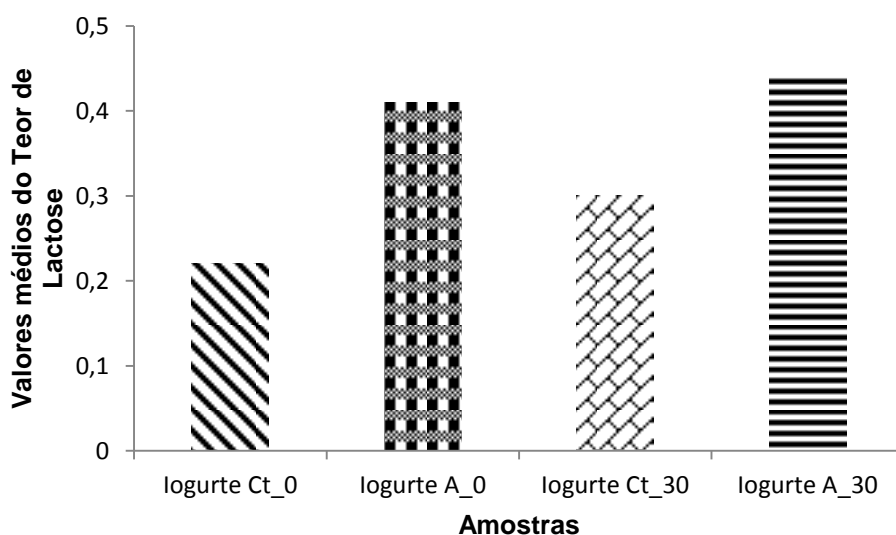


Figura 4.6 - Comparação dos valores médios do teor de lactose, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se aos valores obtidos na base de cálculo Megazyme. As colunas representam os valores médios de lactose.

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte A_30 apresentou um valor médio de lactose de 0,44, superior ao logurte A_0 (0,41), ao logurte Ct_30 (0,30) e ao logurte Ct_0 (0,22). Em termos gerais, verificou-se que não ocorreram alterações acentuadas entre os 0 e 30 dias, no mesmo tipo de iogurte (Controlo e com *Spirulina*). A maior diferença verificada foi entre o logurte A_30 (0,44) e o logurte Ct_0 (0,22).

Nas determinação do teor de lactose para cada amostra de iogurte, tabela 4.1, é visível que o logurte produzido com *Spirulina* apresenta um valor de lactose mais elevado, sendo ainda assim um valor bastante reduzido praticamente nulo, confirmando que o iogurte formulado, tanto o Controlo como com *Spirulina*, são iogurtes sem lactose ideais para pessoas intolerantes à lactose.

4.1.6 Determinação do Teor de Fibras

O teor de proteína foi calculado de acordo com a fórmula do tópico 4.1.2. O teor de cinzas foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{m3 - m2}{m1} \times 100$$

Onde:

$m1$ – massa da toma da amostra (g);

$m2$ - massa cadinho inicial (g);

$m3$ – massa final (cadinho + amostra calcinada) (g).

O teor de fibra alimentar total (TDF-“Total Dietary Fiber”) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{TDF (\%)} = \frac{R \text{ amostra} - P \text{ amostra} - C \text{ amostra} - B}{SW} \times 100$$

$$B = \frac{R1 \text{ branco} + R2 \text{ branco}}{2}$$

Onde:

R – peso médio dos resíduos (mg);

P – peso médio das proteínas (mg);

C – peso médio das cinzas (mg);

B – peso médio dos brancos (mg);

SW – peso médio das amostras (mg);

$R1 \text{ branco} + R2 \text{ branco}$ – peso médio dos resíduos dos brancos (mg).

Relativamente ao tratamento estatístico do teor de fibras, este não foi possível efetuar mais uma vez por falta de valores. Foram efetuadas várias tentativas para a metodologia das fibras, sendo que os valores eram sempre bastante discrepantes, pelo que optei por ficar apenas com os resultados relativos ao dia 0 para ambas as amostras de iogurte (Controlo e com *Spirulina*). Um dos motivos para os resultados serem incertos foi porque ocorreu uma avaria do equipamento na etapa de efetuar o teor proteico. De acordo com o USDA, um iogurte natural apresenta 0% de fibra, sendo que em comparação os valores obtidos nos 2 tipos de iogurte foram bastante elevados. O valor mais elevado no iogurte A_0 pode dever-se à presença de alga, mas mesmo assim não justifica o valor ser tão elevado. Pela razão de não ter amostra em quantidade suficiente para conseguir fazer triplicados na maioria das análises, também não me foi possível efetuar duplicados na etapa das fibras em que se efetua as cinzas e o teor proteico, pelo que nunca tinha muita fiabilidade nos valores obtidos nem tinha mais valores que me permitissem a comparação.

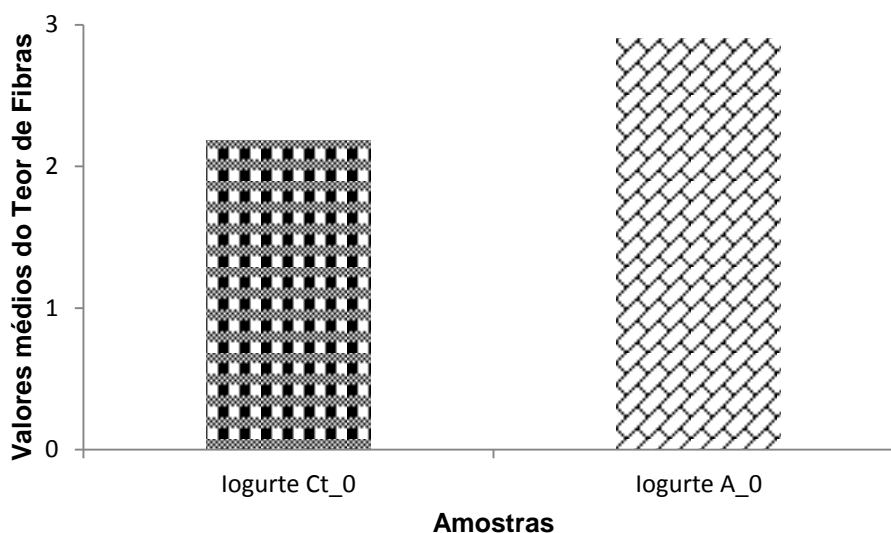


Figura 4.7 - Comparação dos valores médios do teor de fibras, quando comparadas as amostras logurte Ct_0 e logurte A_0. Os resultados referem-se à média das duas experiências independentes realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de fibras.

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte A_0 apresentou um teor médio de fibras de 2,90, superior ao logurte Ct_0 (2,18).

Nas duas repetições da determinação do teor de fibras para cada amostra de iogurte, tabela 4.1, é visível que o logurte produzido com *Spirulina* apresenta um valor de fibras mais elevado, mas como não foi possível verificar as diferenças estatisticamente significativas, não me foi possível tirar qualquer conclusão em termos estatísticos.

4.1.7 Determinação da Cinza Total

O teor de cinzas foi calculado de acordo com a fórmula do tópico 4.1.6. Quando comparadas as 4 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p\text{-value} > 0,05$) em ambos os fatores avaliados (anexo 7.12, tabela 7.12.1 e tabela 7.12.10). De seguida foi efetuada uma ANOVA em relação aos 2 fatores, sendo que no tipo de iogurte, $p\text{-value} > 0,05$, pelo que se conclui que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os 2 tipos de iogurte relativamente ao parâmetro cinza total. Em relação ao fator tempo de produção, na ANOVA obtida, $p\text{-value} < 0,05$ (anexo 7.12, tabela 7.12.11), pelo que se procedeu a um Teste de Comparações múltiplas (anexo 7.12, tabela 7.12.12), recorrendo ao Teste de Tukey. Após análise do Teste, foi possível concluir que apenas são detetadas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as amostras de logurte Ct_0 com logurte A_30 e logurte A_0 com logurte A_30.

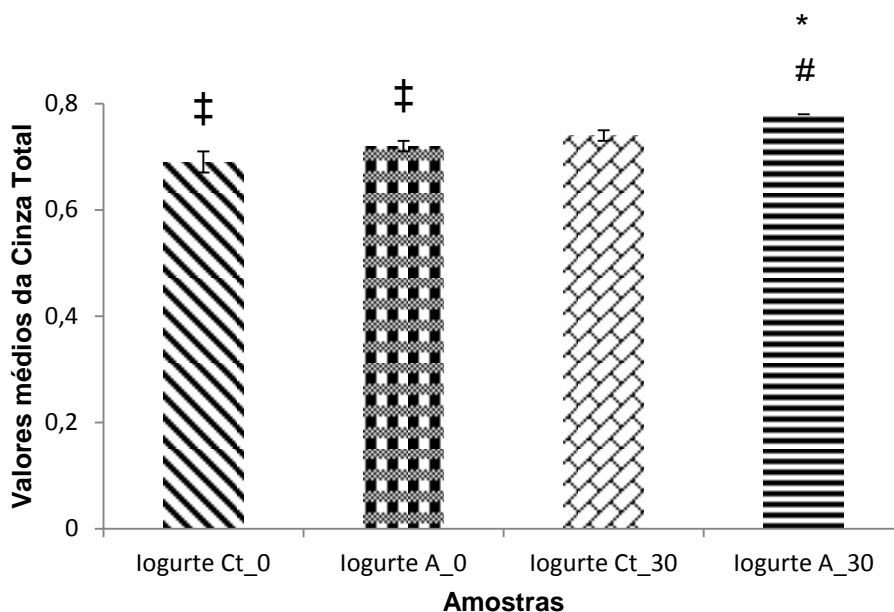


Figura 4.8 - Comparação dos valores médios da cinza total, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das duas experiências independentes realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de cinza. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras logurte Ct_0 (*), com logurte A_0 (#), com logurte Ct_30 (†), com logurte A_30 (‡).

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte A_30 apresentou um valor médio de cinzas de 0,78, superior ao logurte Ct_30 (0,74), ao logurte A_0 (0,72) e ao logurte Ct_0 (0,69). Em termos gerais, verificou-se que não ocorreram alterações acentuadas entre os 0 e 30 dias, sendo os valores não variam muito mesmo entre os 2 tipos de iogurte (Controlo e *Spirulina*). A maior diferença detetada foi entre o logurte A_30 (0,78) e o logurte Ct_0 (0,69).

Nas duas repetições da determinação da cinza total para cada amostra de iogurte, tabela 4.1, não é visível qualquer tipo de iogurte que se tenha destacado por ter valores de cinzas mais elevados, tendo sido detetadas diferenças estatisticamente significativas com base apenas no tempo de produção (0 e 30 dias).

De acordo com um estudo (El-bakri et al., 2009), um iogurte natural apresentou valores de cinzas entre 0,532% e 0,824%, estando os valores obtidos em ambos os iogurtes dentro dos valores obtidos neste estudo.

4.1.8 Determinação do Teor de Humidade

Para a obtenção do teor de humidade realizou-se o seguinte cálculo:

$\text{Humidade (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$	<p>Onde:</p> <p>m_1 – massa da toma da amostra (g);</p> <p>m_2 - massa da toma da amostra após secagem a 105°C (g).</p>
---	---

Quando comparadas as 4 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p\text{-value}>0.05$) em ambos os fatores avaliados (anexo 7.12, tabela 7.12.1 e tabela 7.12.10). De seguida foi efetuada uma ANOVA em relação aos 2 fatores, sendo que no tipo de iogurte, $p\text{-value}<0,05$ (anexo 7.12, tabela 7.12.4), pelo que se procedeu a um Teste de Comparações múltiplas (anexo 7.12, tabela 7.12.5), recorrendo ao Teste de Tukey. Após análise do Teste, foi possível concluir que apenas não são detetadas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as amostras de logurte Ct_0 com logurte A_30. Em relação ao fator tempo de produção, na ANOVA obtida, $p\text{-value}>0,05$ (anexo 7.12, tabela 7.12.11), pelo que se se conclui que não existem diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo de produção para o parâmetro Humidade.

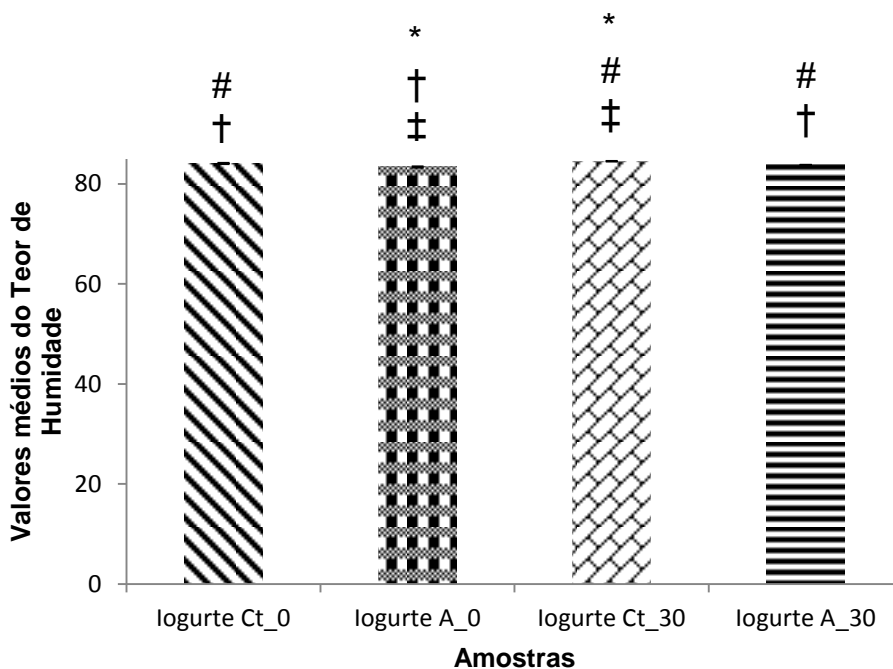


Figura 4.9 - Comparação dos valores médios do teor de humidade, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das duas experiências independentes realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de humidade. As linhas verticais representam a média \pm Desvio- Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p<0.05$) quando comparadas as amostras logurte Ct_0 (*), com logurte A_0 (#), com logurte Ct_30 (†), com logurte A_30 (‡).

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte Ct_30 apresentou um valor médio de humidade de 84,51, superior ao logurte Ct_0 (84,06), ao logurte A_30 (83,79) e ao logurte A_0 (83,38). Em termos gerais, verificou-se que praticamente não ocorreram alterações entre os 0 e 30 dias para o mesmo tipo de iogurte, sendo que a maior diferença verificada foi entre o logurte Ct_30 (84,51) e o logurte A_0 (83,38).

Nas duas repetições da determinação da humidade para cada amostra de iogurte, tabela 4.1, é visível que o iogurte produzido com *Spirulina* apresenta valores de humidade mais reduzidos, tendo sido detetadas diferenças estatisticamente significativas com base no tipo de iogurte (Controlo e com *Spirulina*).

De acordo com o USDA, um iogurte natural apresenta cerca de 87,90% de água, sendo este valor superior a ambos os iogurtes produzidos, com diferença maior entre o iogurte produzido com *Spirulina*, com diferença de 4,42%, não sendo no entanto uma diferença muito elevada que pode existir devido a diferenças na produção do iogurte e ingredientes utilizados.

4.1.9 Determinação da Atividade Antioxidante

Para a obtenção do valor correspondente à percentagem de redução do DPPH foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Redução DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}}{\text{Abs controlo}} \times 100$$

Onde:

Abs amostra – Absorvância da solução de DPPH e amostra;

Abs branco - Absorvância de solvente (etanol) com amostra;

Abs controlo - Absorvância da solução de DPPH com solvente (água destilada).

Quando comparadas as 4 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p\text{-value} > 0.05$) em ambos os fatores avaliados (anexo 7.12, tabela 7.12.1 e tabela 7.12.10). De seguida foi efetuada uma ANOVA, sendo que nos 2 fatores avaliados (tipo de iogurte e tempo de produção), $p\text{-value} > 0,05$ (anexo 7.12, tabela 7.12.4 e tabela 7.12.11), pelo que se conclui que não existem diferenças estatisticamente significativas quando comparados os 2 tipos de iogurte (Controlo e com *Spirulina*), nem em relação ao tempo de produção (0 e 30 dias) relativamente ao parâmetro redução de DPPH.

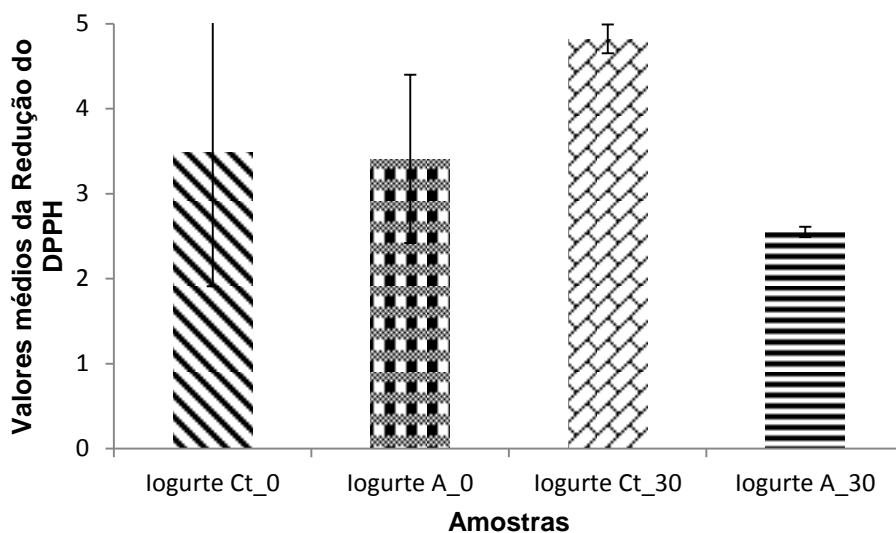


Figura 4.10 - Comparação dos valores médios da redução do DPPH, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das duas experiências independentes realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de redução do DPPH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte Ct_30 apresentou um valor médio de redução de DPPH de 4,82, superior ao logurte Ct_0 (3,49), ao logurte A_0 (3,41) e ao logurte A_30 (2,55). Em termos gerais, verificou-se que não existe uma tendência de crescimento ou declínio ao longo do tempo e que ocorreram algumas alterações entre os 0 e 30 dias, ainda que não muito acentuadas. A maior diferença detetada foi entre o logurte Ct_30 (4,82) e o logurte A_30 (2,55).

Nas duas repetições da determinação da redução de DPPH para cada amostra de iogurte, tabela 4.1, é visível que o logurte produzido com *Spirulina* apresenta um valor de mais reduzido, apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas.

4.1.10 Determinação do pH

Quando comparadas as 6 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram que existem diferenças estatisticamente significativas (p -value <0.05) em ambos os fatores avaliados (anexo 7.12, tabela 7.12.6 e tabela 7.12.13). De seguida foi efetuada o Teste de kruskall-wallis para ambos os fatores, sendo que em relação ao tipo de iogurte (anexo 7.12, tabela 7.12.7), ($\chi^2 = 6,071$, p -value <0.05) foram verificadas diferenças estatisticamente significativas, pelo que se procedeu a um Teste de Comparações Múltiplas, recorrendo ao Teste de Tukey (anexo 7.12, tabela 7.12.8). Após análise do Teste, foi possível concluir que foram detetadas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as amostras de logurte Ct_0 com logurte Ct_15 e logurte A_15, logurte A_0 com logurte Ct_15, logurte Ct_15 com logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30. Relativamente ao fator tempo de

produção (anexo 7.12, tabela 7.12.14), ($\chi^2 = 3,164$, $p\text{-value} > 0,05$) não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo de produção (0, 15 e 30 dias) para o parâmetro pH.

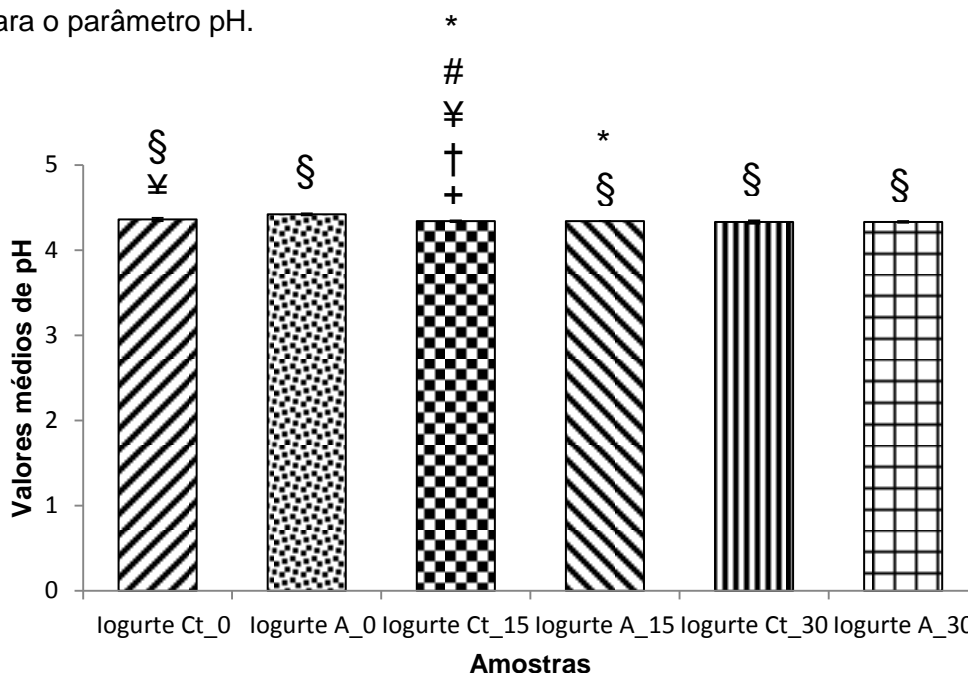


Figura 4.11 - Comparação dos valores médios de pH, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparadas as amostras logurte Ct_0 (*), com logurte A_0 (#), com logurte Ct_15 (§), com logurte A_15 (¥), com logurte Ct_30 (†) e com logurte A_30 (‡).

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte A_0 apresentou um valor médio de pH de 4,42, superior ao logurte Ct_0 (4,36), ao logurte Ct_15 (4,34), ao logurte A_15 (4,34), ao logurte Ct_30 (4,33) e ao logurte A_30 (4,33). Em termos gerais, verificou-se que praticamente não ocorreram oscilações nos valores de pH entre os 0 e 30 dias, sendo que a maior diferença detetada foi entre o logurte A_0 (4,42) e o logurte Ct_30 e logurte A_30 (4,33).

Nas três repetições da determinação do pH para cada amostra de iogurte, tabela 4.1, é visível que não houve um tipo de iogurte que se tenha destacado por ter valores de pH mais elevados e apesar de os valores serem muito próximos uns dos outros, existem diferenças estatisticamente significativas em relação ao tipo de iogurte (Controlo e com *Spirulina*).

De acordo com um estudo (El-bakri et al., 2009), um iogurte natural apresentou valores de pH entre os 4,52 e os 4,72, estando estes valores um pouco acima dos

obtidos em ambos os iogurtes, o que sugere que são um pouco mais ácidos.

4.1.11 Determinação da Cor

O delta E (ΔE), que corresponde à diferença total de cor foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

$$\Delta L = L \text{ amostra} - L \text{ padrão}$$

$$\Delta a = a \text{ amostra} - a \text{ padrão}$$

$$\Delta b = b \text{ amostra} - b \text{ padrão}$$

Onde:

ΔL – Variação da luminosidade entre o preto (escuro) e o branco (claro);

Δa – Variação da luminosidade entre o vermelho e o verde;

Δb – Variação da luminosidade entre o amarelo e o azul.

Quando comparadas as 4 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram a ausência do valor de p-value, pelo que não é possível avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas em qualquer um dos fatores avaliados (anexo 7.12, tabela 7.12.1 e tabela 7.12.10), pela falta de dados suficientes para a aplicação do método estatístico.

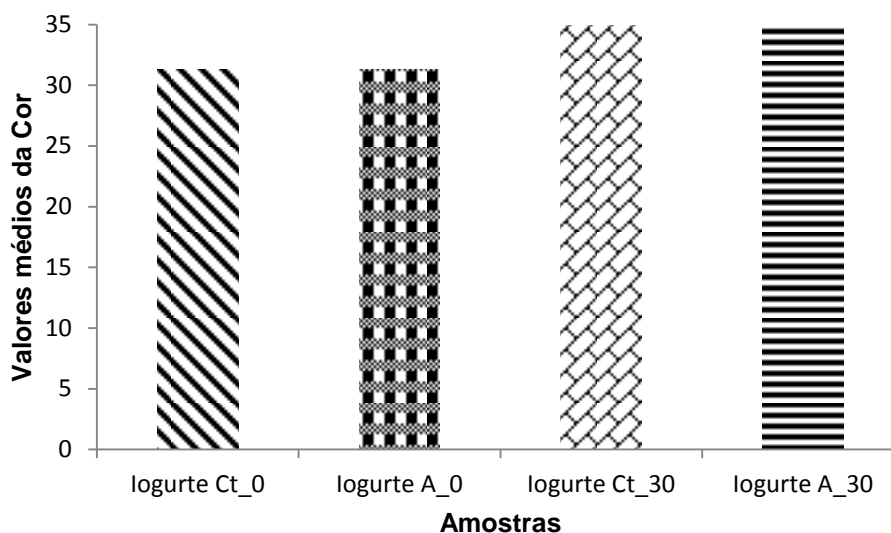


Figura 4.12- Comparação dos valores médios da cor, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se ao valor de ΔE , obtido a partir da média das três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios da Cor. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP).

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte Ct_30 e o logurte A_30 apresentaram um valor médio da Cor de 34,88, superior ao logurte Ct_0 e ao logurte A_0 (31,26). Em termos gerais, verificou-se que ao longo do tempo ocorreu um aumento no valor da diferença de Cor (ΔE).

Na determinação da cor para cada amostra de iogurte, tabela 4.1, é visível que ambos os 2 tipos de iogurte ao dia 30 apresentam um valor mais elevado, apesar de não ser possível tirar quaisquer conclusões em termos estatísticos.

Relativamente às coordenadas utilizados no Sistema CIELAB para calcular a diferença de cor, nomeadamente no L (luminosidade), os valores obtidos foram sempre positivos, ainda que mais elevados no caso do iogurte Controlo, por ser branco. Na coordenada a (conteúdo de vermelho a verde), foram sempre obtidos valores negativos, o que significa vermelho, sendo que o iogurte com alga apresentou valores mais elevados, por ter uma tonalidade azul esverdeada. Por fim, na coordenada b (conteúdo de amarelo a azul), ambos os iogurtes apresentaram valores positivos que corresponde ao amarelo e esta foi a única variável onde não se verificaram diferenças nos valores entre os 2 iogurtes.

4.1.12 Determinação dos Hidratos de Carbono

A determinação do teor de hidratos de carbono foi obtida de modo indireto, através dos valores das cinzas, matéria gorda e humidade (%). Para a obtenção do valor correspondente aos hidratos de carbono foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Hidratos de Carbono (\%)} = 100 - (P + C + H + G)$$

Onde:

P – valor da proteína (%);
C – valor das cinzas (%);
H – valor da humidade (%);
G – valor da matéria gorda (%).

Quando comparadas as 4 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p\text{-value} > 0.05$) em ambos os fatores avaliados (anexo 7.12, tabela 7.12.1 e tabela 7.12.10). De seguida foi efetuada uma ANOVA para ambos os fatores, sendo que em relação ao tipo de iogurte (anexo 7.12, tabela 7.12.4), $p\text{-value} < 0.05$ pelo que se procedeu a um Teste de Comparações Múltiplas, recorrendo ao Teste de Tukey (anexo 7.12, tabela 7.12.5). Após análise do Teste, foi possível concluir que apenas não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as amostras de iogurte Ct_0 com iogurte Ct_30 e iogurte A_0 com iogurte A_30. Relativamente ao fator tempo de produção (anexo 7.12, tabela 7.12.11), $p\text{-value} > 0,05$ pelo que se conclui que não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo de produção (0 e 30 dias).

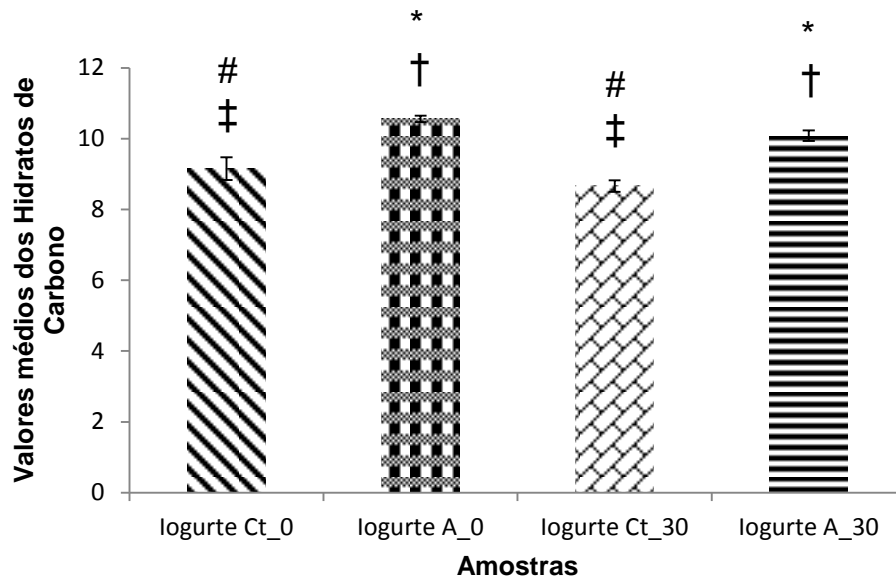


Figura 4.13 - Comparação dos valores médios dos hidratos de carbono, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se ao cálculo efetuado a partir dos valores médios de proteína, cinzas, matéria gorda e humidade, realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios de hidratos de carbono. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparadas as amostras logurte Ct_0 (*), com logurte A_0 (#), com logurte Ct_30 (†) e com logurte A_30 (‡).

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte A_0 apresentou um valor médio de hidratos de carbono de 10,56, superior ao logurte A_30 (10,08), ao logurte A_0 (9,15) e ao logurte Ct_30 (8,66). Em termos gerais, verificou-se que apesar de não terem ocorrido alterações acentuadas ao longo do tempo, os valores mais elevados foram registados ao dia 0, para os 2 tipos de iogurte, sendo que a maior diferença registada foi entre o logurte A_0 (10,56) e o logurte Ct_30 (8,66).

Nas duas repetições da determinação dos hidratos de carbono para cada amostra de iogurte, tabela 4.1, é visível que o logurte produzido com *Spirulina* apresenta um teor de hidratos mais elevado, tendo sido detetadas diferenças estatisticamente significativas entre os 2 tipos de iogurte (Controlo e com *Spirulina*).

De acordo com o USDA, um iogurte natural apresenta cerca de 4,66% de hidratos de carbono, sendo este valor bastante inferior a ambos os iogurtes produzidos, com diferença maior entre o iogurte produzido com *Spirulina*, com diferença de 5,9%. Devido ao facto dos hidratos de carbono terem sido calculados de modo indireto e nesse cálculo entra o valor da proteína que foi superior, é normal que o valor obtido seja também mais elevado, mas apenas no iogurte produzido com *Spirulina*, o que confere pois este tem um valor de hidratos mais elevado em relação ao controlo. Outra diferença pode dever-se ao facto de na produção de ambos os iogurtes se ter utilizado um iogurte natural açucarado

em vez de um iogurte natural, aumentando assim a carga de hidratos de carbono.

4.1.13 Determinação do Valor Energético

A determinação do valor energético foi obtida de modo indireto, através dos valores das cinzas, matéria gorda e humidade (%). Para a obtenção do valor correspondente aos hidratos de carbono foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Valor Energético (kcal)} = (4 \times P) + (9 \times G) + (4 \times H)$$

Onde:

P – valor da proteína (%);

G – valor da matéria gorda (%).

H – valor dos hidratos de carbono (%);

Quando comparadas as 4 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p\text{-value} > 0.05$) em ambos os fatores avaliados (anexo 7.12, tabela 7.12.1 e tabela 7.12.10). De seguida foi efetuada uma ANOVA para ambos os fatores, sendo que em relação ao tipo de iogurte (anexo 7.12, tabela 7.12.4), $p\text{-value} < 0.05$ pelo que se procedeu a um Teste de Comparações Múltiplas, recorrendo ao Teste de Tukey (anexo 7.12, tabela 7.12.5). Após análise do Teste, foi possível concluir que apenas foram detetadas diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as amostras de iogurte Ct_0 com iogurte A_30. Relativamente ao fator tempo de produção (anexo 7.12, tabela 7.12.11), $p\text{-value} > 0,05$ pelo que se conclui que não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo de produção (0 e 30 dias).

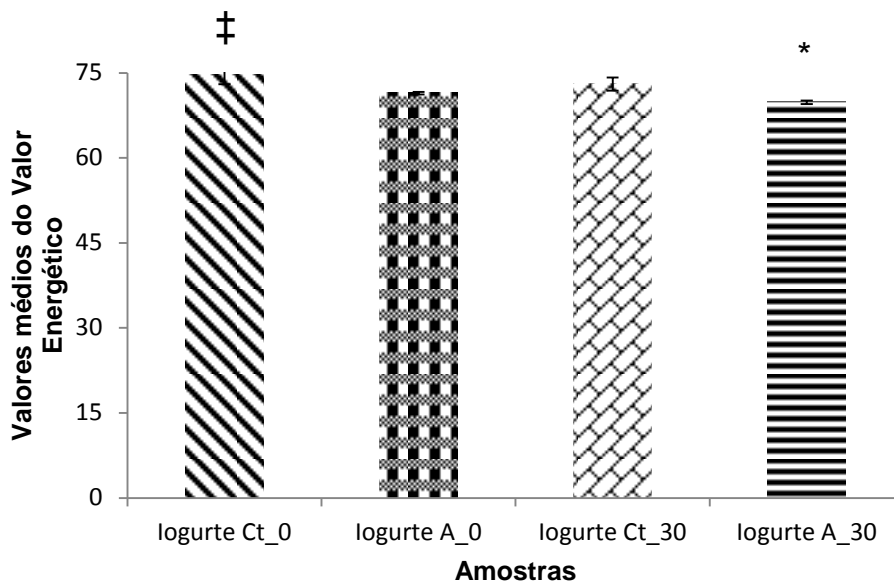


Figura 4.14 - Comparação dos valores médios do valor energético, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se ao cálculo efetuado a partir dos valores de proteína, matéria gorda e hidratos de carbono, realizadas em duplicado. As colunas representam os valores médios do valo energético. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras logurte Ct_0 (*) com logurte A_30 (‡).

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte Ct_0 apresentou um valor médio de valor energético de 74,65, superior ao logurte Ct_30 (73,05), ao logurte A_0 (71,43) e ao logurte A_30 (69,81). Em termos gerais, verificou-se que apesar de não terem ocorrido alterações acentuadas ao longo do tempo, os valores mais elevados foram registados ao dia 0, para os 2 tipos de iogurte, sendo que a maior diferença registada foi entre o logurte Ct_0 (74,65) e o logurte A_30 (69,81).

Nas duas repetições da determinação do valor energético para cada amostra de iogurte, tabela 4.1, é visível que o logurte produzido com *Spirulina* apresenta um valor energético mais reduzido, tendo sido detetadas diferenças estatisticamente significativas entre os 2 tipos de iogurte (Controlo e com *Spirulina*).

De acordo com o USDA, um iogurte natural apresenta cerca de 61kcal, sendo este valor inferior a ambos os iogurtes produzidos, com diferença maior entre o iogurte Controlo, com diferença de 13,65kcal. O valor obtido em ambos os iogurtes foi superior provavelmente por se ter utilizado um iogurte natural açucarado para a produção dos mesmos e pela fórmula para cálculo indireto entrar o valor dos hidratos e de proteína, sendo ambos (à exceção do controlo no caso da proteína) já mais elevados do que os valores mencionados no USDA.

4.2 Análises Microbiológicas

Os resultados obtidos nas diferentes análises microbiológicas realizadas encontram-se discriminados na tabela 4.2 em baixo apresentada.

Tabela 4.2 - Resultados obtidos nas diferentes análises microbiológicas, onde logurte Ct_0, A_0, Ct_15, A_15, Ct_30 e A_30 correspondem às médias das duas repetições em cada fator de diluição.

T (dias)	Amostra	Parâmetros Analisados							
		Microrganismos Totais Aeróbios (ufc/g)	Microrganismos Totais Anaeróbios (ufc/g)	<i>E. coli</i> (ufc/g)	Enterobactérias (ufc/g)	<i>Salmonella</i> (ufc/g)	<i>L. monocytogenes</i> (ufc/g)	<i>Lactobacillus</i> sp. (ufc/g)	<i>Streptococcus</i> (ufc/g)
0	logurte Ct_0	195 1,95x10 ²	575 5,75x10 ²	0	0	0	0	0	320 3,2x10 ²
	logurte A_0	5 5x10 ⁰	25 2,5x10 ¹	0	0	0	0	225 2,25x10 ²	50 5x10 ¹
15	logurte Ct_15	10 1x10 ¹	5 5x10 ¹	0	0	0	0	195 1,95x10 ²	0
	logurte A_15	25 2,5x10 ¹	20 2x10 ¹	0	0	0	0	130 1,3x10 ²	0
30	logurte Ct_30	30 3x10 ¹	25 2,5x10 ¹	0	0	0	0	380 3,8x10 ²	355 3,55x10 ²
	logurte A_30	20 2x10 ¹	0	0	0	0	0	105 1,05x10 ²	45 4,5x10 ¹

4.2.1 Tratamento Estatístico

Com o objetivo de averiguar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as amostras (logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30, logurte A_30), para os parâmetros em análise (Microrganismos Totais Aeróbios, Microrganismos Totais Anaeróbios, *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus*) foi realizada uma ANOVA (anexo 7.12, tabela 7.12.17) ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (anexo 7.12, tabela 7.12.16 e tabela 7.12.19), dependendo da violação ou não dos pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias (anexo 7.12, tabela 7.12.15 e tabela 7.12.18). Foram efetuados os testes estatísticos com base em dois fatores diferentes: o tipo de iogurte e o tempo de produção. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados através do software IBM SPSS Statistics 21.0. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância (α) de 0,05.

Com o objetivo de determinar as componentes principais que expliquem o máximo possível da variação total dos dados com o menor número possível de componentes, foi efetuado o teste estatístico PCA. De referir que todos os pressupostos inerentes à realização do PCA, nomeadamente a prévia realização de um DCA, onde foi observado o valor de “length of gradient”, de modo a perceber se as variáveis respondem aproximadamente de forma linear aos gradients (anexo 7.12, figura 7.12.4 e figura 7.12.5).

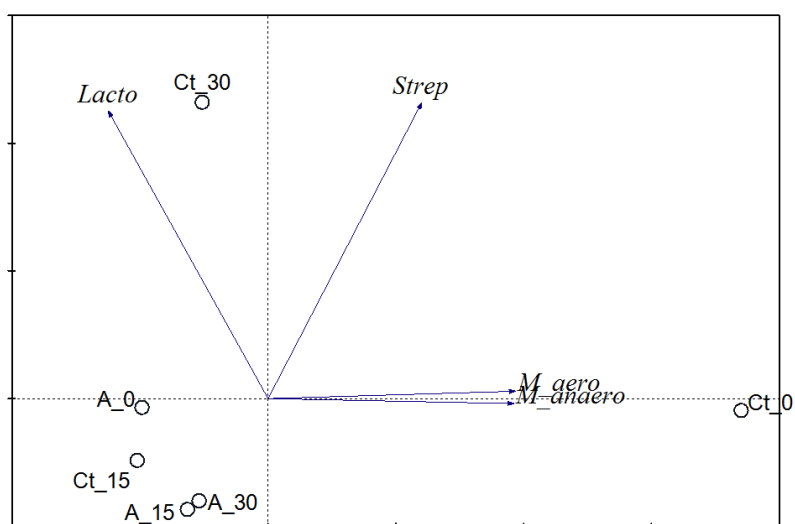


Figura 4.15 - Representação gráfica (CanoDraw) do PCA com base nos parâmetros microbiológicos (Microrganismos Totais Aeróbios, Microrganismos Totais Anaeróbios, *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus*), em relação às diferentes amostras e respetivos tempos (logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30).

Através da observação do gráfico acima representado foi possível constatar que em relação aos Microrganismos Totais Aeróbios (M_aero) e Microrganismos Totais Anaeróbios (M_anaero), a amostra que apresenta maior densidade é logurte Ct_0. Em relação a *Lactobacillus* sp. (Lacto) e *Streptococcus* (Strep), a amostra logurte Ct_30 apresenta uma maior densidade.

Em relação ao tipo de relações existentes entre os parâmetros microbiológicos, é possível indicar como tendo uma relação inversa: Microrganismos Totais Aeróbios com *Lactobacillus* sp. e Microrganismos Totais Anaeróbios com *Lactobacillus* sp. A relação inversa é caracterizada pela existência de um ângulo superior a 90° entre os parâmetros, sendo que quando um aumenta o outro diminui. Em termos de relações nulas, não é possível indicar nenhum caso. A relação nula é caracterizada pela existência de um ângulo de 90° entre os parâmetros, sendo que não existe qualquer relação entre os mesmos. Quando o ângulo existente entre os parâmetros é inferior a 90°, significa que existe realmente correlação entre os mesmos, sendo que quando um aumento o outro também aumenta. Este tipo de correlação ocorre entre: Microrganismos Totais Aeróbios e Microrganismos Totais Anaeróbios, Microrganismos Totais Aeróbios e *Streptococcus*, Microrganismos Totais Anaeróbios e *Streptococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* sp. Quanto menor o ângulo, maior a correlação.

4.2.2 Microrganismos Totais Aeróbios

Quando comparadas as 6 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram que existem diferenças estatisticamente significativas ($p \text{ value} < 0.05$), em ambos os fatores avaliados (tipo de iogurte e tempo de produção) (anexo 7.12, tabela 7.12.15 e tabela 7.12.18), tendo sido efetuado de seguida um Teste de Kruskal-wallis. Em relação ao fator tipo de iogurte ($\chi^2 = 1,190$, $p\text{-value} > 0,05$) (anexo 7.12, tabela 7.12.16), o qual indicou a ausência de diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as 2 amostras de logurte (Controlo e com *Spirulina*). Relativamente ao fator tempo de produção ($\chi^2 = 0,286$, $p\text{-value} > 0,05$) (anexo 7.12, tabela 7.12.19), o qual indicou a ausência de diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as amostras de logurte entre os vários tempos de produção (dia 0, 15 e 30).

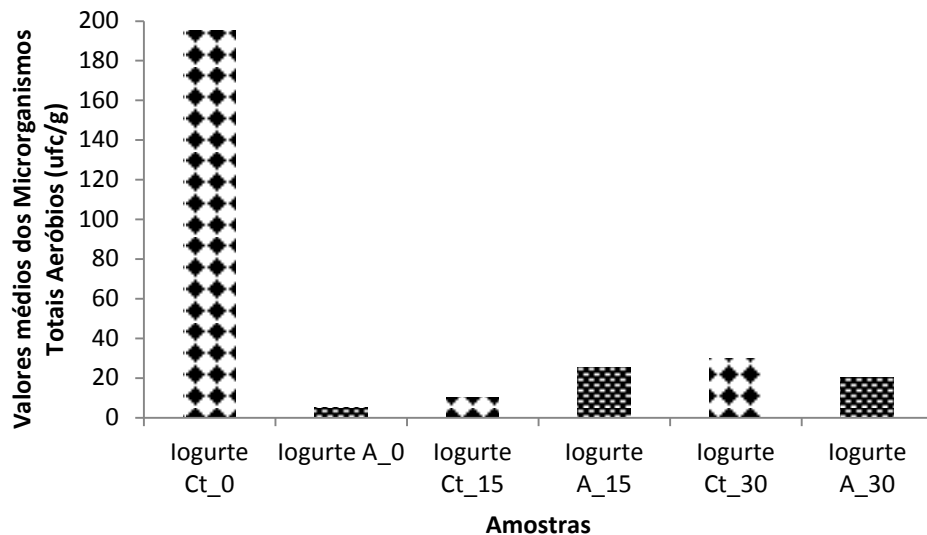


Figura 4.16 - Comparação dos valores médios dos microrganismos totais aeróbios, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das contagens por placa, tendo em conta o fator de diluição. As colunas representam os valores médios dos M_aero.

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte Ct_0 apresentou um valor médio de microrganismos totais aeróbios de 195, superior ao logurte Ct_30 (30), ao logurte A_15 (25), ao logurte A_30 (20), ao logurte Ct_15 (10) e ao logurte A_0 (5). Em termos gerais, verificou-se apenas uma alteração acentuada ao longo do tempo, no caso do iogurte Ct_0 reduzir o seu valor de forma repentina do dia 0 para o dia 15, sendo que de resto os valores não oscilam muito entre eles. Não se verificou uma tendência para aumentar ou reduzir ao longo do tempo, em nenhum dos iogurtes. A maior diferença registada foi entre o logurte Ct_0 (195) e o logurte A_0 (5).

Na determinação dos M_aero para cada amostra de iogurte, tabela 4.2, é visível que o logurte produzido com *Spirulina* apresenta um valor mais elevado ao dia 15, não tendo sido detetadas diferenças estatisticamente significativas. Para efeitos de comparação, foi efetuada uma análise microbiológica a um iogurte da marca Nutrégi sem lactose com aroma de morango, que deu um valor médio de 5 ufc/g, igual ao iogurte com alga ao dia 0 mas inferior aos restantes, tendo em conta que não foi avaliado ao longo do tempo.

4.2.3 Microrganismos Totais Anaeróbios

Quando comparadas as 6 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram que existem diferenças estatisticamente significativas ($p \text{ value} < 0.05$), em ambos os fatores avaliados (tipo de iogurte e tempo de produção) (anexo 7.12, tabela 7.12.15 e tabela 7.12.18), tendo sido efetuado de seguida

um Teste de Kruskal-wallis. Em relação ao fator tipo de iogurte ($\chi^2 = 0,784$, $p\text{-value} > 0,05$) (anexo 7.12, tabela 7.12.16), o qual indicou a ausência de diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as 2 amostras de logurte (Controlo e com *Spirulina*). Relativamente ao fator tempo de produção ($\chi^2 = 2,721$, $p\text{-value} > 0,05$) (anexo 7.12, tabela 7.12.19), o qual indicou a ausência de diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as amostras de logurte entre os vários tempos de produção (dia 0, 15 e 30).

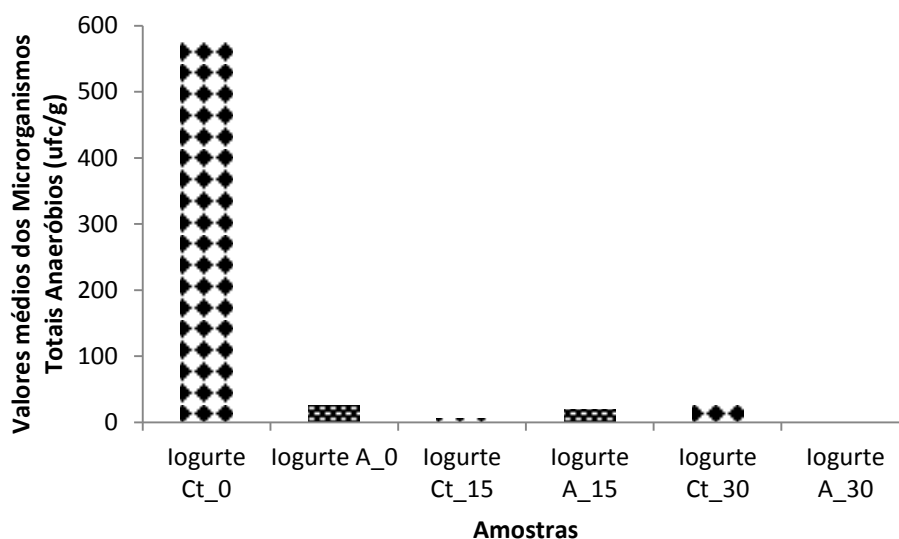


Figura 4.17 - Comparação dos valores médios dos microrganismos totais anaeróbios, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das contagens por placa, tendo em conta o fator de diluição. As colunas representam os valores médios dos M_anaero.

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte Ct_0 apresentou um valor médio de microrganismos totais anaeróbios de 575, superior ao logurte Ct_30 (25), ao logurte A_0 (25), ao logurte A_15 (20), ao logurte Ct_15 (5) e ao logurte A_30 (0). Em termos gerais, verificou-se apenas uma alteração acentuada ao longo do tempo, no caso do iogurte Ct_0 reduzir o seu valor de forma abrupta do dia 0 para o dia 15, sendo que de resto os valores oscilam pouco entre eles. Apenas se verificou uma tendência para reduzir ao longo do tempo, no caso do logurte com *Spirulina*. A maior diferença registada foi entre o logurte Ct_0 (575) e o logurte A_30 (0).

Na determinação dos M_anaero para cada amostra de iogurte, tabela 4.2, é visível que o logurte produzido com *Spirulina* apresenta um valor mais elevado ao dia 0, não tendo sido detetadas diferenças estatisticamente significativas. Para efeitos de comparação, foi efetuada uma análise microbiológica a um iogurte da marca Nutrégi sem lactose com aroma de morango, que deu um valor médio de 25 ufc/g, igual ao iogurte controlo ao dia 30 e ao iogurte com alga ao dia 0.

4.2.4 *Escherichia coli* (*E.coli*)

Na determinação de *E. coli* para cada amostra de iogurte, tabela 4.2, é visível que em todas as amostras, em todos os tempos de produção, o resultado é sempre nulo. Devido ao facto de não ter valores, não foi possível efetuar uma análise estatística.

Segundo a revista da “ASAE – Riscos e Perigos Alimentares em Leites e derivados”, *Escherichia coli* 0157:H7 está referenciada como perigo biológico associado ao leite, pelo que pode também surgir durante a produção de iogurte, mas geralmente só em grande quantidade nos alimentos é que podem causar doenças.

De acordo com o livro “Handbook of Marine Microalgae”, a ficocianina purificada, obtida a partir da alga *S. platensis* tem efeito inibitório no crescimento de algumas bactérias como é o caso de *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Apesar de a quantidade de *S. platensis* adicionada ao iogurte ser reduzida, esta possui efeito antimicrobiano no iogurte, ao longo do tempo (30 dias).

4.2.5 Enterobactérias

Na determinação das Enterobactérias para cada amostra de iogurte, tabela 4.2, é visível que em todas as amostras, em todos os tempos de produção, o resultado é sempre nulo. Devido ao facto de não ter valores, não foi possível efetuar uma análise estatística. O facto de não terem sido detetadas estas bactérias em nenhum dos iogurtes ao longo dos 30 dias é sinal que desde os ingredientes utilizados (leite pasteurizado e iogurte), que apresentavam segurança alimentar controlada, até à manipulação dos mesmos para a produção de iogurte e armazenamento do mesmo foram tidos todos os cuidados higiénicos necessários.

4.2.6 *Salmonella*

Na determinação de *Salmonella* para cada amostra de iogurte, tabela 4.2, é visível que em todas as amostras, em todos os tempos de produção, o resultado é sempre nulo. Devido ao facto de não ter valores, não foi possível efetuar uma análise estatística.

Segundo a revista da “ASAE – Riscos e Perigos Alimentares em Leites e derivados”, *Salmonella* spp. está referenciada como perigo biológico associado ao leite, pelo que pode também surgir durante a produção de iogurte. Graças à pasteurização, os agentes microbianos patogénicos associados ao leite e seus derivados são

imediatamente destruídos, com uma margem razoável de segurança. Devido à sua frequência e gravidade, a Salmonelose, doença infecciosa causada por uma bactéria do género *Salmonella*, sendo que algumas salmonelas não são patogénicas. Por ser essencialmente encontrada nas fezes humanas e de animais, é transmitida através da ingestão de alimentos contaminados por material fecal. Caso exista falta de higiene, alimentos como é o caso do leite, carne e ovos podem conter esta bactéria.

4.2.7 *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*)

Na determinação de *L.monocytogenes* para cada amostra de iogurte, tabela 4.2, é visível que em todas as amostras, em todos os tempos de produção, o resultado é sempre nulo. Devido ao facto de não ter valores, não foi possível efetuar uma análise estatística.

Segundo a revista da “ASAE – Riscos e Perigos Alimentares em Leites e derivados”, *Listeria monocytogenes* está referenciada como perigo biológico associado ao leite, pelo que pode também surgir durante a produção de iogurte. Devido à sua frequência e gravidade, a Listeriose tem reputação de causar grandes surtos de infeções nos produtos lácteos. *L. monocytogenes* é eliminada durante a pasteurização, sendo a contaminação pós-pasteurização uma das principais preocupações.

4.2.8 *Lactobacillus* sp.

Quando comparadas as 6 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram que existem diferenças estatisticamente significativas ($p \text{ value} < 0.05$), mas apenas num dos fatores avaliados (tempo de produção) (anexo 7.12, tabela 7.12.15 e tabela 7.12.18). Em relação ao fator tipo de iogurte, de seguida foi efetuada uma ANOVA (anexo 7.12, tabela 7.12.17), onde $p\text{-value} > 0,05$, sendo possível concluir que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os 2 tipos de iogurte (Controlo e com *Spirulina*). Relativamente ao fator tempo de produção, foi efetuado o Teste de Kruskal-wallis ($\chi^2 = 3,529$, $p\text{-value} > 0,05$) (anexo 7.12, tabela 7.12.19), o qual indicou a ausência de diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as amostras de iogurte entre os vários tempos de produção (dia 0, 15 e 30).

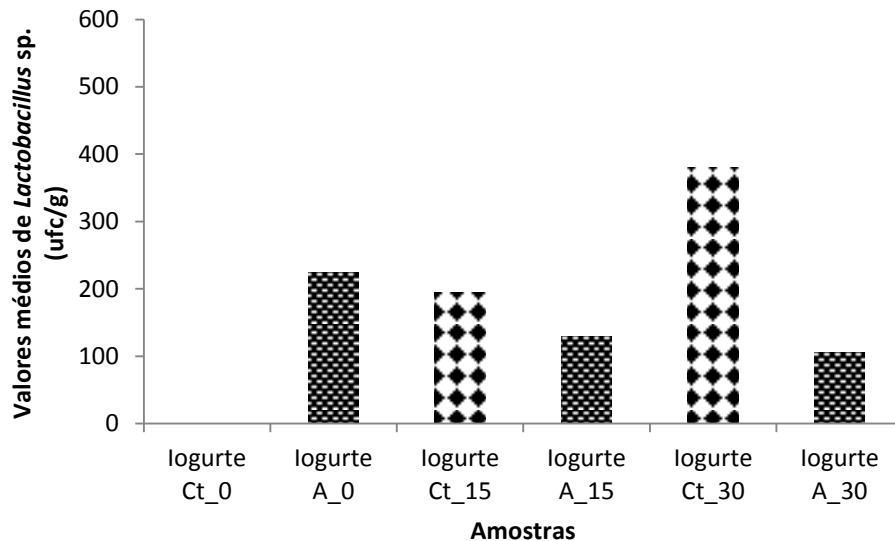


Figura 4.18 - Comparação dos valores médios de *Lactobacillus* sp., quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das contagens por placa, tendo em conta o fator de diluição. As colunas representam os valores médios de *Lactobacillus* sp.

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte Ct_30 apresentou um valor médio de *Lactobacillus* sp. de 380, superior ao logurte A_0 (225), ao logurte Ct_15 (195), ao logurte A_15 (130), ao logurte A_30 (105) e ao logurte Ct_0 (0). Em termos gerais, verificou-se apenas uma alteração acentuada ao longo do tempo, nomeadamente do logurte Ct_0 para o logurte Ct_15. Neste caso foram detetadas duas tendências ao longo do tempo, sendo que em relação ao logurte Controlo, este aumenta ao longo do tempo, enquanto no caso do logurte com *Spirulina*, este reduz ao longo do tempo. A maior diferença registada foi entre o logurte Ct_30 (380) e o logurte Ct_0 (0).

Na determinação dos *Lactobacillus* sp., para cada amostra de iogurte, tabela 4.2, é visível que o logurte produzido com *Spirulina* apenas apresenta valores mais elevados comparativamente ao logurte Controlo ao tempo 0. Não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas. Para efeitos de comparação, foi efetuada uma análise microbiológica a um iogurte da marca Nutrégi sem lactose com aroma de morango, que deu um valor médio de 655 ufc/g, bastante superior aos valores obtidos, sendo que na produção do iogurte em termos industriais, é possível que a taxa de LAB não seja proporcional 1:1. De acordo com um estudo (Sabbah, M. T. et al., 2012), a diferença na taxa de proporção pode levar à alteração dos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e sensoriais.

4.2.9 *Streptococcus*

Quando comparadas as 6 amostras, os resultados obtidos no Teste da Homogeneidade de Variâncias indicaram que existem diferenças estatisticamente significativas ($p \text{ value} < 0.05$), em ambos os fatores avaliados (tipo de iogurte e tempo de

produção) (anexo 7.12, tabela 7.12.15 e tabela 7.12.18), tendo sido efetuado de seguida um Teste de Kruskal-wallis. Em relação ao fator tipo de iogurte ($\chi^2 = 0,784$, $p\text{-value} > 0,05$) (anexo 7.12, tabela 7.12.16), o qual indicou a ausência de diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as 2 amostras de iogurte (Controlo e com *Spirulina*). Relativamente ao fator tempo de produção ($\chi^2 = 0,286$, $p\text{-value} > 0,05$) (anexo 7.12, tabela 7.12.19), o qual indicou a ausência de diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as amostras de iogurte entre os vários tempos de produção (dia 0, 15 e 30).

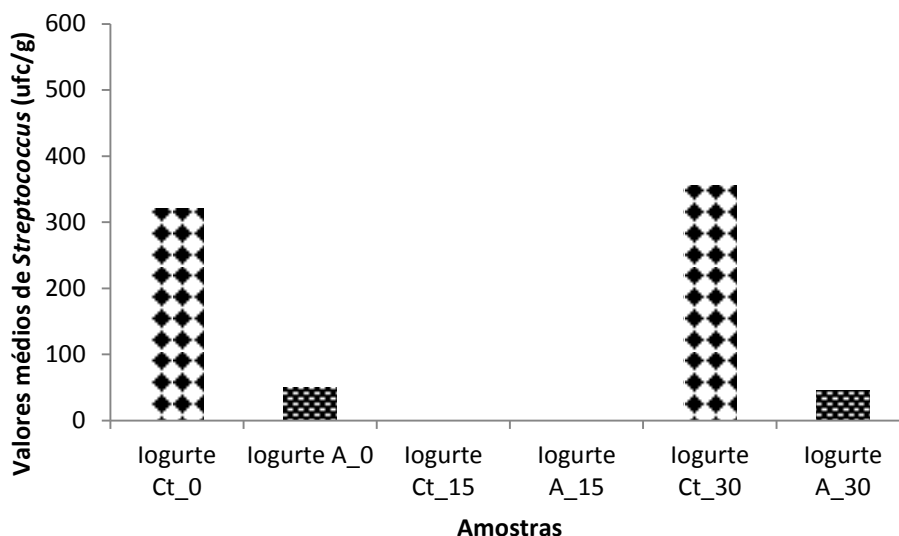


Figura 4.19 - Comparação dos valores médios de *Streptococcus*, quando comparadas as amostras logurte Ct_0, logurte A_0, logurte Ct_15, logurte A_15, logurte Ct_30 e logurte A_30. Os resultados referem-se à média das contagens por placa, tendo em conta o fator de diluição. As colunas representam os valores médios de *Streptococcus*.

Adicionalmente é ainda possível concluir que o logurte Ct_30 apresentou um valor médio de *Streptococcus* de 355, superior ao logurte Ct_0 (320), ao logurte A_0 (50), ao logurte A_30 (45), ao logurte Ct_15 (0) e ao logurte A_15 (0). Em termos gerais, verificou-se algumas alterações bastante acentuadas ao longo do tempo, sendo que nos 2 tipos de iogurte, ao dia 15 apresentam valor nulo. À parte do dia 15, os valores obtidos para ambos os iogurtes são bastante homogêneos. A maior diferença registada foi entre o logurte Ct_30 (355) e o logurte Ct_15 (0) e logurte A_15 (0).

Na determinação de *Streptococcus*, para cada amostra de iogurte, tabela 4.2, é visível que o logurte produzido com *Spirulina* apenas valores bastante mais baixos relativamente ao logurte Controlo, à exceção do dia 15. Não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas. Para efeitos de comparação, foi efetuada uma análise microbiológica a um iogurte da marca Nutrégi sem lactose com aroma de morango, que deu um valor médio de 40 ufc/g, apenas superior aos valores obtidos no caso de ambos

os iogurtes ao dia 15. Tendo em conta o valor obtido para *Lactobacillus* sp., é visível que existe uma diferença na taxa 1:1 de LAB.

4.3 Análise Sensorial

Os resultados obtidos na análise sensorial de aceitação efetuada com iogurte produzido com leite meio gordo com lactose, entre 3 amostras diferentes (I5, I6 e I7) encontram-se demonstrados no anexo 7.12, tabela 4.12.20.

Os resultados obtidos na análise sensorial de aceitação efetuada com iogurte produzido a partir de leite meio gordo sem lactose, entre 3 amostras diferentes (L3A, L3FT e L3AM) encontram-se demonstrados no anexo 7.12, tabela 7.12.30.

Relativamente aos resultados obtidos na análise sensorial afetiva efetuada com iogurte produzido a partir de leite meio gordo com lactose e leite meio gordo sem lactose, entre 2 amostras diferentes (567-iogurte com lactose e 891-iogurte sem lactose) encontram-se demonstrados no anexo 7.12, tabela 7.12.40.

Por fim, os resultados obtidos na análise sensorial triangular efetuada com iogurte produzido com leite meio gordo sem lactose ao fim de 0 e 30 dias, entre 3 amostras diferentes (1, 2 e 3) encontram-se demonstrados no anexo 7.12, tabela 7.12.45.

4.3.1 Tratamento Estatístico

No caso das provas de aceitação, com o objetivo de averiguar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ao longo das várias provas sensoriais em termos de aceitabilidade, foi realizado o Teste de Independência do Qui-Quadrado (anexo 7.12, tabela 7.12.28 e tabela 7.12.37), com base no fator amostra de iogurte. No caso da prova afetiva, com o objetivo de averiguar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as amostras e os fatores avaliados, foi realizada uma ANOVA (anexo 7.12, tabela 7.12.42), com base no género e idade do provador. Por fim, no caso da prova triangular, com o objetivo de averiguar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as amostras e os fatores avaliados, foi realizada uma ANOVA (anexo 7.12, tabela 7.12.45), com base no género do provador. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados através do software IBM SPSS Statistics

21.0. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância (α) de 0,05.

Com o objetivo de simplificar a informação através da representação de relações entre um conjunto de variáveis, através de um menor número de características, foi efetuado o teste estatístico AF (Análise Fatorial) também nas provas de aceitação. As relações entre as variáveis observadas decorrem da sua relação com variáveis não observadas (fatores comuns), expressando o que existe de comum nas variáveis originais. De referir que todos os pressupostos inerentes à realização da AF, nomeadamente a prévia realização do Teste KMO e Bartlett e Matriz anti-imagem, onde foi observada a hipótese de correlação entre as variáveis (anexo 7.12, tabela 7.12.21, tabela 7.12.22, tabela 7.12.23, tabela 7.12.30, tabela 7.12.31 e tabela 7.12.32). Este teste foi efetuado apenas nas provas de aceitação.

Em termos de intensidade, os resultados obtidos nas provas sensoriais de aceitação foram ilustrados recorrendo a um gráfico Radar e/ou Aranha, por ser de fácil entendimento e análise (figura 4.21 e 4.24).

4.3.2 Prova de Aceitação de Iogurte produzido com Leite Meio Gordo com Lactose

Após verificação dos pressupostos para efetuar a Análise Fatorial, foram realizados vários passos até chegar ao gráfico onde é visível a relação entre os componentes e as variáveis (Figura 4.20), nomeadamente as Comunalidades onde se verifica a proporção de variância comum presente numa variável. De acordo com os resultados obtidos (anexo 7.12, tabela 7.12.24), a percentagem de variância comum das variáveis nos fatores extraídos foi superior a 50% para todas as variáveis, à exceção do odor. De seguida foi efetuada a Variância Total Explicada (anexo 7.12, tabela 7.12.25), onde é observada a percentagem da variância que os fatores são capazes de explicar, e a percentagem de variância explicada acumulada em cada fator. Tendo em conta que só são retidos os componentes com Eigenvalue superior a 1, foram retidos 2 componentes, que em conjunto explicam aproximadamente 75% da variabilidade total dos dados, o que foi comprovado pelo Scree Plot (anexo 7.12, figura 7.12.6). Após o Scree Plot foi efetuada a Matriz de Componentes após rotação (anexo 7.12, tabela 7.12.26), onde foi verificado que em relação ao componente 1, este discrimina os parâmetros odor e a cor, sendo que em relação ao componente 2, este apenas discrimina a textura.

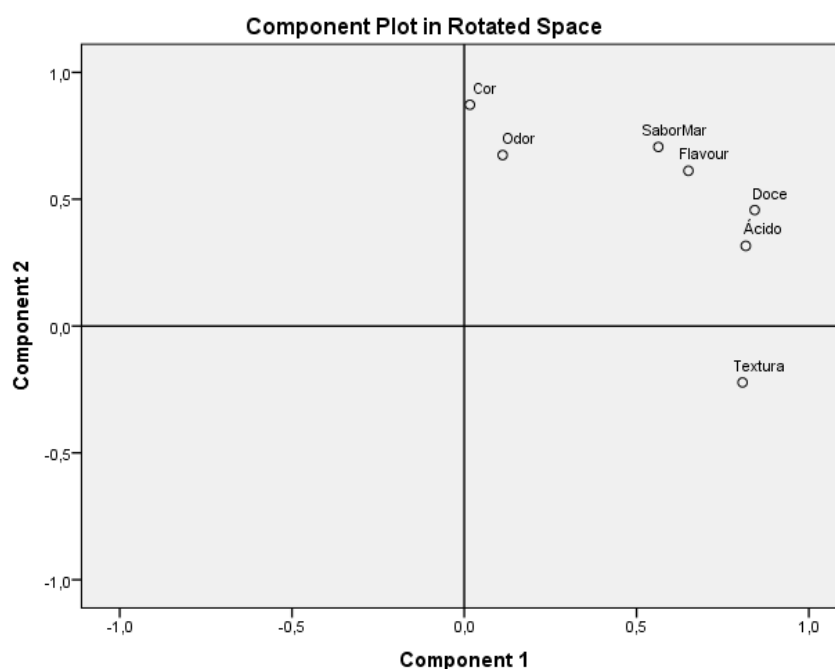


Figura 4.20 – Representação gráfica da solução proveniente da análise fatorial, após rotação.

Tabela 4.3 - Resultados obtidos na *Component Score Coefficient Matrix*.

	Component	
	1	2
Odor	-,128	,346
Cor	-,228	,482
Doce	,290	,027
Ácido	,315	-,045
Textura	,456	-,342
SaborMar	,085	,241
Flavour	,153	,165

Após análise da figura e tabela acima, é possível concluir que em relação ao componente 1, a textura apresenta um valor mais elevado (0,456), seguindo-se o ácido (0,315) e o doce (0,290), sendo portanto a textura o parâmetro mais importante a interpretar, não sendo invariante para os dados. Relativamente ao componente 2, é a cor que apresenta o valor mais elevado (0,482), seguindo-se o odor (0,346) e o sabor a produtos do mar (0,241). Na tabela 4.3 é possível entender como cada variável se relaciona com os scores dos componentes calculados para cada variável, sendo que correlações item componentes superiores a 0,1 são consideradas satisfatórias, no caso do componente 1 ocorreram correlações fracas nos parâmetros cor, odor e sabor a produtos do mar, enquanto no componente 2 foi nos parâmetros textura, ácido e doce. Para verificar a análise da confiabilidade pelo método da consistência interna, foi realizada a análise *Reliability* e verificado o alfa de Cronbach (0,865) dos conjuntos de

variáveis correspondentes a cada componente (anexo 7.12, tabela 7.12.27). Acima de 0,5 o valor de alfa é considerado satisfatório.

Em termos de intensidade, de modo a perceber como os provadores avaliaram as amostras, foi efetuado o gráfico de Radar.

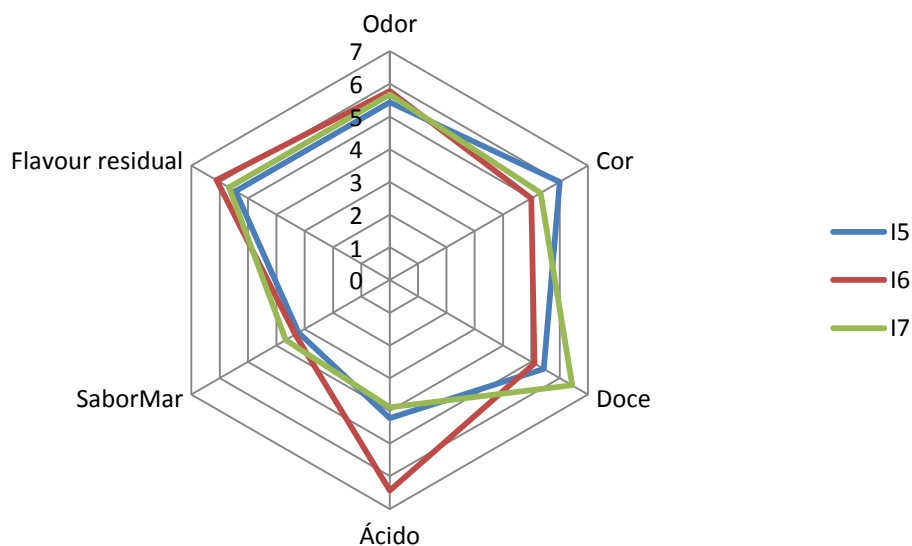


Figura 4.21 – Representação gráfica da intensidade avaliada pelos provadores.

Após análise da figura acima, é possível concluir que em o iogurte I5 apresenta uma intensidade mais elevada apenas em relação à cor, o iogurte I6 apresenta uma intensidade mais elevada em relação ao odor, ácido e flavour residual. Por fim o iogurte I7 tem uma maior intensidade relativamente ao doce e sabor.

De seguida foi efetuada uma análise da preferência entre os 3 tipos de iogurte (I5, I6 e I7), onde claramente a amostra I5 obteve a maioria (56%), sendo considerada a amostra preferida.

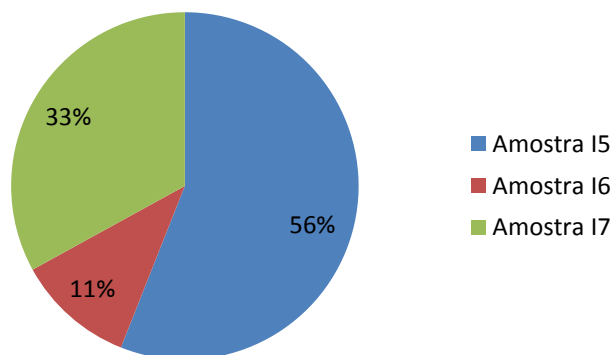


Figura 4.22 – Representação gráfica da preferência por parte dos provadores.

Quando comparadas as 3 amostras, os resultados obtidos no Teste do Qui-Quadrado indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p \text{ value} > 0.05$) entre todos os parâmetros avaliados e as 3 amostras de iogurte (I5, I6 e I7) (anexo 7.12, tabela 7.12.28), concluindo-se que são independentes.

4.3.3 Prova de Aceitação de iogurte produzido com Leite Meio Gordo sem Lactose

Após verificação dos pressupostos para efetuar a Análise Fatorial, foi verificada na Matriz Anti-imagem que o tamanho da amostra não era adequado, devido ao parâmetro Cor ter o valor inferior a 0,5, pelo que foi efetuada a AF sem o mesmo. Foi efetuado o gráfico onde é visível a relação entre os componentes e as variáveis (Figura 4.23), nomeadamente as Comunalidades (anexo 7.12, tabela 7.12.33) onde de acordo com os resultados obtidos, a percentagem de variância comum das variáveis nos fatores extraídos foi superior a 50% para todas as variáveis. De seguida foi efetuada a Variância Total Explicada (anexo 7.12, tabela 7.12.34), onde foram retidos 2 componentes, que em conjunto explicam aproximadamente 73% da variabilidade total dos dados, o que foi comprovado pelo Scree Plot (anexo 7.12, figura 7.12.7). Após o Scree Plot foi efetuada a Matriz de Componentes após rotação (anexo 7.12, tabela 7.12.35), onde foi verificado que em relação ao componente 1, este não discrimina qualquer parâmetro, sendo que em relação ao componente 2, este discrimina o odor e a textura.

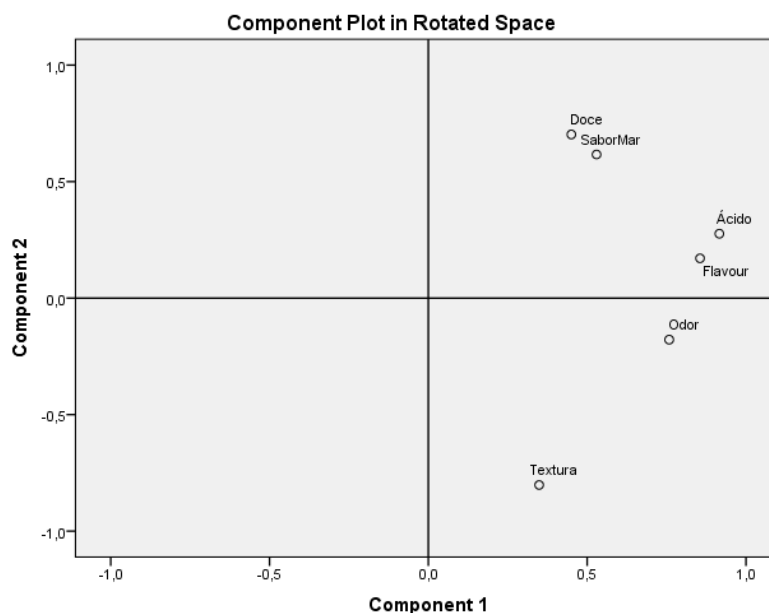


Figura 4.23 – Representação gráfica da solução proveniente da análise fatorial, após rotação.

Tabela 4.3.1 - Resultados obtidos na *Component Score Coefficient Matrix*.

	Component	
	1	2
Odor	,329	-,233
Doce	,073	,397
Ácido	,323	,045
Textura	,260	-,584
SaborMar	,118	,328
Flavour	,315	-,016

Após análise da figura e tabela acima, é possível concluir que em relação ao componente 1, o odor apresenta um valor mais elevado (0,329), seguindo-se o ácido (0,323) e o flavour (0,315), sendo portanto o odor o parâmetro mais importante a interpretar, não sendo invariante para os dados. Relativamente ao componente 2, é o doce que apresenta o valor mais elevado (0,397), seguindo-se o sabor a produtos do mar (0,328). Na tabela 4.3.1 é possível entender como cada variável se relaciona com os scores dos componentes calculados para cada variável, sendo que correlações item componentes superiores a 0,1 são consideradas satisfatórias, no caso do componente 1 ocorreram correlações fracas apenas no parâmetro doce, enquanto no componente 2 foi nos parâmetros odor, ácido, textura e flavour. Para verificar a análise da confiabilidade pelo método da consistência interna, foi realizada a análise *Reliability* e verificado o alfa de Cronbach (0,746) dos conjuntos de variáveis correspondentes a cada componente (anexo 7.12, tabela 7.12.36). Acima de 0,5 o valor de alfa é considerado satisfatório.

Em termos de intensidade, de modo a perceber como os provadores avaliaram as amostras, foi efetuado o gráfico de Radar.

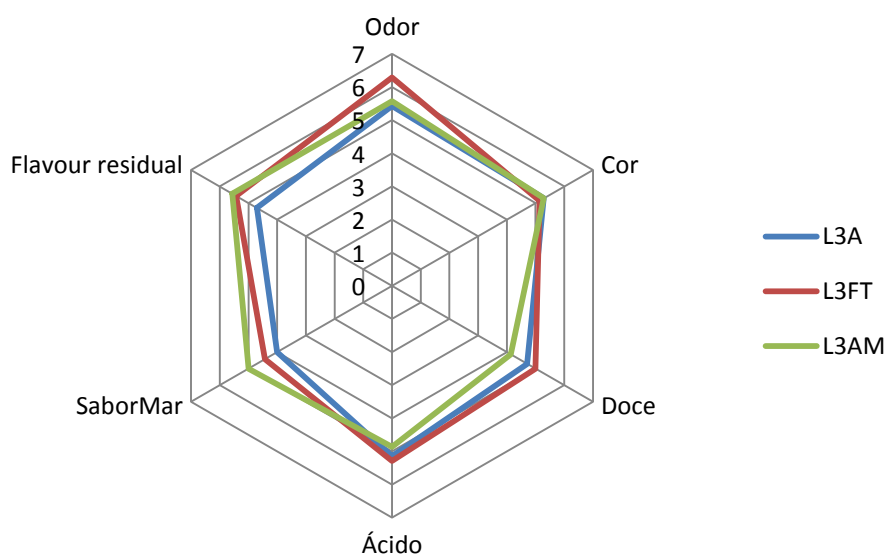


Figura 4.24 – Representação gráfica da intensidade avaliada pelos provadores.

Após análise da figura acima, é possível concluir que em o iogurte L3A apresenta uma intensidade igual a L3AM em relação à cor, o iogurte L3FT apresenta uma intensidade mais elevada em relação ao odor, ácido e doce. Por fim o iogurte L3AM tem uma maior intensidade relativamente à cor, sabor a produtos do mar e flavour residual.

De seguida foi efetuada uma análise da preferência entre os 3 tipos de iogurte (L3A, L3FT e L3AM), onde claramente a amostra L3A (iogurte sem lactose, com agar como espessante) obteve a maioria (71%), sendo considerada a amostra preferida.

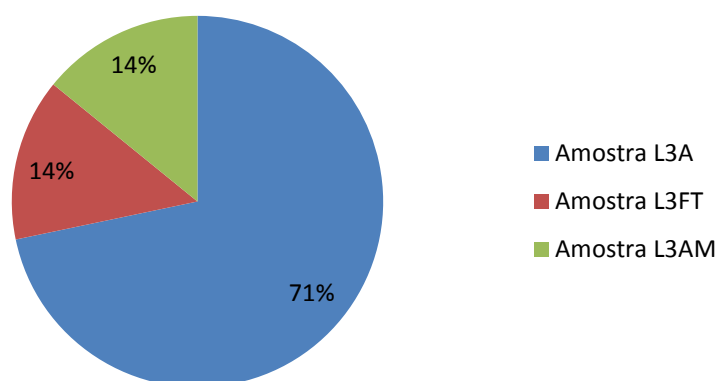


Figura 4.25 – Representação gráfica da preferência por parte dos provedores.

Quando comparadas as 3 amostras em relação ao fator amostra de iogurte, os resultados obtidos no Teste do Qui-Quadrado indicaram que existem diferenças estatisticamente significativas ($p \text{ value} < 0.05$) apenas nos parâmetros doce e ácido, (anexo 7.12, tabela 7.12.37), sendo possível constatar que estes parâmetros não são independentes da amostra de iogurte (L3A, L3FT e L3AM).

4.3.4 Prova Afetiva

Quando efetuado o Teste da Homogeneidade de Variâncias, os resultados indicaram que apenas existem diferenças estatisticamente significativas ($p \text{ value} < 0.05$) quando o fator avaliado foi a idade (anexo 7.12, tabela 7.12.39 e tabela 7.12.41). Em relação ao fator idade, de seguida foi efetuado o Teste de Kruskal-wallis ($\chi^2 = 12,243$, $p \text{ value} > 0,05$) (anexo 7.12, tabela 7.12.40), o qual indicou a ausência de diferenças estatisticamente significativas quando analisadas as escolhas dos provedores em relação à amostra preferida, comparativamente à sua idade. Relativamente ao fator género do provedor, foi efetuada uma ANOVA (anexo 7.12, tabela 7.12.42), onde $p \text{ value} > 0,05$, sendo possível concluir que não existem diferenças estatisticamente significativas nas escolhas da amostra preferida em relação ao género do provedor.

De seguida foi efetuada uma análise da preferência entre os 2 tipos de iogurte (iogurte com lactose e iogurte sem lactose), onde claramente a amostra com lactose obteve a maioria (66%), sendo considerada a amostra preferida. Esta foi a amostra final considerada para efeitos de análises físico-químicas e microbiológicas.

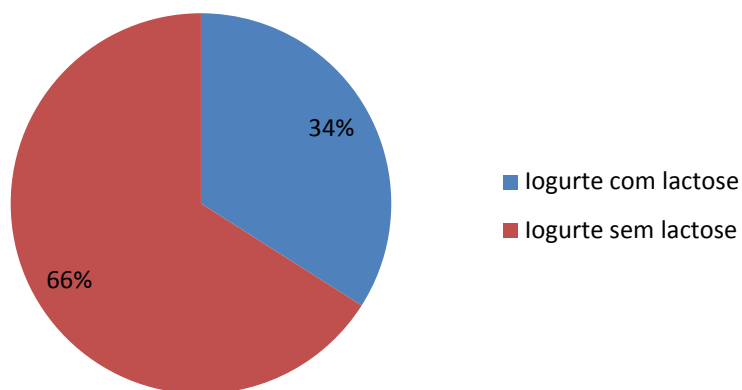


Figura 4.26 – Representação gráfica da preferência por parte dos provadores entre o iogurte com lactose e o iogurte sem lactose.

4.3.5 Prova Triangular

Quando efetuado o Teste da Homogeneidade de Variâncias, os resultados indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0.05$) em qualquer um dos parâmetros avaliados (Amostra diferente e Amostra preferida) quando o fator avaliado foi o género do provador (anexo 7.12, tabela 7.12.44). De seguida foi efetuada uma ANOVA (anexo 7.12, tabela 7.12.45), onde $p > 0,05$, sendo possível concluir que não existem diferenças estatisticamente significativas nas escolhas da amostra diferente e amostra preferida em relação ao género do provador.

De seguida foi efetuada uma análise da preferência entre os 2 tipos de iogurte (iogurte com 0 dias e iogurte com 30 dias), onde a amostra com 0 dias obteve a maioria (63%), sendo considerada a amostra preferida.

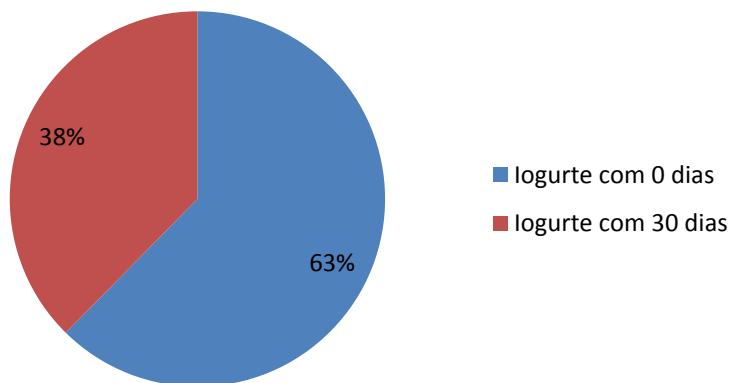


Figura 4.27 – Representação gráfica da preferência por parte dos provadores entre o iogurte com 0 dias e o iogurte com 30 dias.

Em relação à amostra diferente escolhida pelos provadores, dos 16 provadores, apenas 7 (44%) acertaram na resposta entre as 3 amostras, provando que mesmo ao fim de 30 dias, a maioria não conseguiu distinguir entre o iogurte acabado de fazer e o iogurte com 30 dias, o que comprova que mesmo ao fim deste tempo o iogurte ainda apresentava um sabor, odor e textura agradáveis.

5. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos ao longo desta dissertação denotou-se que o iogurte suplementado com *Spirulina* é um produto bastante inovador e com qualidade nutricional elevada, indicado para o consumo. Tendo em conta o teor de proteína bruta obtido nas diferentes amostras verificou-se que as amostras com alga apresentam sempre um valor mais elevado em relação às amostras sem alga, o que leva a crer que apesar de a quantidade de alga adicionada ao iogurte não ser elevada, é o suficiente para aumentar o teor proteico. Ao longo do tempo, não ocorreram grandes variações no teor proteico, o que por sua vez sugere que o tempo não afeta o teor de proteína bruta. Em relação ao teor de matéria gorda, verificou-se que as amostras sem alga apresentam sempre um valor mais elevado em relação às amostras com alga, o que sugere que de alguma forma a alga interage com a matriz do iogurte de modo a diminuir a disponibilidade de gordura livre que pode ser extraída e quantificada através do método utilizado. Ao longo do tempo também não ocorreram grandes variações no teor de matéria gorda. No que diz respeito à determinação da acidez, tal como ocorreu no teor de matéria gorda, verificou-se que as amostras sem alga apresentam sempre um valor mais elevado em relação às amostras com alga, o que leva a crer que a presença da alga atenua a acidez existente por natureza no iogurte. Ao longo do tempo não ocorreram grandes variações no valor de acidez, o que indica a estabilidade da fermentação. Em relação ao teor de lactose, o iogurte com alga apresentou valores mais elevados ainda que bastante reduzidos, comparativamente ao iogurte sem alga. Os valores são bastante reduzidos (abaixo de 0,5%), pelo que é considerado um iogurte sem lactose. Não se verificaram grandes alterações no teor de lactose ao longo do tempo. Para o teor de fibras, só foi possível analisar os resultados obtidos ao tempo 0, tendo-se obtido valores bastante elevados em comparação com os valores usuais para os iogurtes. Nesta determinação possivelmente estão erros associados a falhas nos equipamentos e falta de amostra, pelo que de futuro seria aconselhável repetir. No que diz respeito à cinza total, não é possível indicar um tipo de iogurte que se tenha destacado por ter sempre valores mais elevados, mas a comparar as 4 amostras, o iogurte A_30 apresentou um valor mais elevado. Não ocorreram alterações elevadas nem ao longo do tempo nem entre amostras. No teor de humidade, é possível indicar o iogurte sem alga que apresentou sempre valores mais elevados em relação ao iogurte com alga, ainda que a diferença entre estes seja mínima. Não ocorreram alterações elevadas ao longo do tempo. Em relação à determinação da atividade antioxidante, ao contrário do que seria de esperar, o iogurte sem alga apresentou sempre um valor de redução de DPPH mais elevado em

relação ao iogurte com alga, provavelmente devido a erros experimentais. Ao longo do tempo, ocorreram algumas alterações entre as amostras, sendo que a alteração mais acentuada foi entre o iogurte sem alga, com valor mais elevado ao dia 30. No valor de pH obtido, apesar de o iogurte com alga ter apresentado um valor mais elevado, em comparação com as 6 amostras, não houve um tipo de iogurte que se tenha destacado por apresentar sempre valores mais elevados, sendo que as variações quer ao longo do tempo, quer entre amostra tenham sido mínimas. Relativamente à cor, verificou-se que as amostras ao dia 30 apresentam um valor de ΔE mais elevado em relação do dia 0, tendo em conta que neste parâmetro, apesar de se tentar ser o mais similar possível em todas as medições, há vários fatores que podem influenciar na medição da cor, como a fonte de luz e as condições de superfície. Na determinação dos hidratos de carbono, o iogurte com alga apresentou sempre valores mais elevados em relação ao iogurte sem alga, o que sugere que os hidratos de carbono presentes na microalga contribuem para aumentar ligeiramente o teor de hidratos de carbono final, tal como no caso do teor proteico. Não ocorreram alterações elevadas ao longo do tempo. Em relação ao valor energético, o iogurte sem alga destacou-se por apresentar valores mais elevados em relação ao iogurte com alga, ainda que as diferenças tenham sido reduzidas. Não ocorreram alterações elevadas ao longo do tempo.

Relativamente às análises microbiológicas, na determinação dos microrganismos totais aeróbios e anaeróbios, o iogurte Ct_0 destacou-se por apresentar um valor bastante elevado comparativamente às restantes amostras. Ao longo do tempo, as variações mais acentuadas ocorreram entre o iogurte sem alga. Em relação a *E. coli*, enterobactérias, *Salmonella* e *L. monocytogenes*, os valores obtidos em todas as amostras ao longo do tempo deu sempre valor nulo, o que comprova que o iogurte não está contaminado com estes agentes, alguns patogénicos, causadores de grande risco para a saúde humana. Relativamente às bactérias lácticas, nomeadamente *Lactobacillus* sp., a amostra Ct_30 apresentou um valor mais elevado, ainda que com grandes discrepâncias ao longo do tempo. No caso do iogurte com alga, os valores reduziram gradualmente ao longo do tempo. Para *Streptococcus*, em ambos os iogurtes ao dia 15 o valor foi nulo, sendo que de resto o iogurte sem alga apresenta valores mais elevados comparativamente ao iogurte com alga. À exceção do dia 15, não ocorreram alterações acentuadas ao longo do tempo.

Por fim, em relação à análise sensorial, conclui-se que sem terem conhecimento da diferença entre as amostras, 66% dos provadores preferiram o iogurte sem lactose

utilizando agar como espessante, tendo sido com base neste resultado que foi selecionado este iogurte para efetuar as respectivas análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, o que é ótimo por ser um produto indicado para indivíduos com intolerância à lactose. Relativamente à prova triangular, em termos de preferência, apesar de 63% dos provadores terem preferido o iogurte com 0 dias, foi possível verificar que a maioria dos provadores (56%) não escolheu a amostra diferente corretamente, pelo que se conclui que ao fim de 30 dias o iogurte continua com sabor, odor e textura agradáveis para o consumidor.

6. Referências Bibliográficas

- Asemi, Z., Jazayeri, S., Najafi, M., Samimi, M., Mofid, V., Shidfar, F., Foroushani, A.R., Shahaboddin, M.E. – Effects of daily consumption of probiotic yoghurt on inflammatory factors in pregnant women: a randomized controlled trial. *Pak J Biol Sci.* 2011. 14(8):476-482.
- Beydoun, M.A., Gary, T.L., Caballero, B.H., Lawrence, R.S., Cheskin, L.J., Wang, Y. – Ethnic differences in dairy and related nutrient consumption among US adults and their association with obesity, central obesity, and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2008. 87:1914–1925.
- Buttriss, J. – Nutritional properties of fermented milk products. *Int J Dairy Tech.* 1997. 50:21–7.
- Chamorro, G., Salazar, M., Araujo, K.G., Santos, C.P., Ceballos, G., Castillo, L.F. – Update on the pharmacology of *Spirulina* (Arthrospira), an unconventional food. *Arch. Latinoam. Nutr.* 2002. 52(3):232-240.
- Chandan, R. – Manufacturing yogurt and fermented milks. 1st Edition. Australia: Blackwell Publishing, 2006. ISBN-13: 978-0-8138-2304-1.
- Codex Alimentarius – Milk and Milk Products. 2nd Edition. Roma: Electronic Publishing Policy and Support Branch, 2011. ISBN 978-92-5-105837-4.
- Deng, R. and Chow, T.J. – Hypolipidemic, Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular therapeutics.* 2010. 28(4):33-45.
- Derner, R.B., Ohse, S., Villela, M., Carvalho, S.M., Fett, R. – Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural.* v.36, n.6, p.1959-1967, 2006.
- Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M. and Wang, B.G. – Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chem.* 2006. 95:37-43.
- El bakri, J.M. and El Zubeir, I.E.M. – Chemical and Microbiological Evaluation of Plain and Fruit Yoghurt in Khartoum State, Sudan. *Int. J. Dairy Sci.* 2009. 4(1):1-7.
- Flora, R. – Yogurt Forever: The Yogurt Encyclopaedia. 2002.
- Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., Morelli, L. "Should yoghurt cultures be considered probiotic?". *Br J Nutr.* 2005. 93(6):783-786.
- Henrikson, R. *Microalga Spirulina – Superalimento del futuro.* Barcelona: Ediciones Urano, 1994. ISBN 84-7953-047-2.
- Hu, Q. and Richmond, A. – Productivity and photosynthetic efficiency of *Spirulina platensis* as affected by light intensity, algal density and rate of mixing in a flat plate photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* 1996. 8:139-145.
- Ivey, K.L., Lewis, J.R., Hodgson, J.M., Zhu, K., Dhaliwal, S.S., Thompson, P.L., Prince, R.L. – Association between yogurt, milk, and cheese consumption and common carotid

artery intima-media thickness and cardiovascular disease risk factors in elderly women. *Am J Clin Nutr.* 2011. 94(1):234–239.

Kim, S.K. – *Handbook of Marine Microalga, Biotechnology Advances*. 1st Edition. Academic Press, 2015. ISBN: 978-0-12-800776.1.

Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M., Divanach, P. – Anti-bacterial activity in microalgae cultures. *Aquacult. Res.* 2012. 43:1520-1527.

Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Wright, A.V. - *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 4th Edition. United States of America: CRC Press, 2012. ISBN: 978-1-4398-3677-4.

Latysheva, N., Junker, V.L., Palmer, W.J., Codd, G.A., Barker, D. – The evolution of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Bioinformatics.* 2012. 28(5):603-606.

Mater, D.D., Bretigny, L., Firmesse, O., Flores, M.J., Mogenet, A., Bresson, J.L., Corthier, G. – *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiol Lett.* 2005. 250(2):185-7.

Mohamadshahi, M., Veissi, M., Haidari, F., Shahbazian, H., Kaydani, G., Mohammadi, F. – Effects of probiotic yogurt consumption on inflammatory biomarkers in patients with type 2 diabetes. *BiolImpacts.* 2014. 4(2):83-88.

Mozaffarian, D., Hao, T., Rimm, E.B., Willett, W.C., Hu, F.B. – Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N Engl J Med.* 2011. 364(25):2392–2404.

Nacional Yogurt Association. 2006. Position Statement on Probiotics.

Pirt, S.J. – *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. New York: John Wiley & Sons, 1975. ISBN: 0470690380.

Pulz, O. and Gross, W. – Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. 65(6):635-648.

Radke-Mitchell, L.C. and Sandine, W.E. – Influence of Temperature on Associative Growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 1986. 69(10):2558-2568.

Rule, C. - *Yogurt Culture: a global look at how to make, bake, sip, and chill the world's creamiest, healthiest food*. New York: A Rux Martin Book, 2015. ISBN 978-0-544-25171-7.

Sabbah, M.T., Legowo, A.M., Pramono, Y.B. – The effects of different ratio of bacteria (*Lactobacillus bulgaricus* + *Streptococcus thermophilus* and bifidobacterium longum. ATCC15707) on characteristics of yogurt at different storage period. *Journal of Applied Food Technology.* 2012. 1(2):32-38.

Sahni, S., Tucker, K.L., Kiel, D.P., Quach, L., Casey, V.A., Hannan, M.T. – Milk and yogurt consumption are linked with higher bone mineral density but not with hip fracture: the Framingham Offspring Study. *Arch Osteoporos.* 2013. 8(0):119.

Sarada, D.V.L., Kumar, C.S., Rengasamy, R. – Purified C-phycoyanin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria. *World J. Microb. Biot.* 2011. 27:779-783.

Tong, X., Dong, J.Y., Wu, Z.W., Li, W., Qin, L.Q. – Dairy consumption and risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Clin Nutr.* 2011. 65(9):1027–31.

Soukoulis C., Panagiotidis P., Koureli R., Tzia C. – Industrial Yogurt Manufacture: Monitoring of Fermentation Process and Improvement of Final Product Quality. *J. Dairy Sci.* 2007. 90:2641-2654.

Unal G., El, S.N., Kiliç, S. – In vitro determination of calcium bioavailability of milk, dairy products and infant formulas. *Int J Food Sci Nutr.* 2005. 56(1):13–22.

Vonshak, A. – *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). Physiology, cell-biology and biotechnology, London: Taylor & Francis, 1997.

Axel F. Sigurdsson, <http://www.docsoption.com/health-and-nutrition/hscrp/>; consultado dia 25-05-2015

Benjamim Starr 2012, Total Milk Consumption per capita and Global Lactose Intolerance, [visualnews.com](http://www.visualnews.com/2012/11/15/sweden-loves-their-milk-map-of-milk-consumption/), <http://www.visualnews.com/2012/11/15/sweden-loves-their-milk-map-of-milk-consumption/>; consultado dia 1 de Julho 2015

ChartsBin statistics collector team 2011, Current Worldwide Total Milk Consumption per capita, [ChartsBin.com](http://chartsbin.com/view/1491), <http://chartsbin.com/view/1491>; consultado dia 01-07-2015

<http://danone.com.br/tudo-sobre-iogurte/processo-de-producao/>; consultado dia 25-05-2015

<http://www.diabetes.co.uk/what-is-hba1c.html>; consultado dia 8-05-2015

<http://www.mimosa.com.pt/cnam/saude-artigos-e-dossiers/intolerancia-a-lactose/o-que-e-a-intolerancia-a-lactose/>; consultado dia 26-05-2015

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lvl=0&id=118562>; consultado dia 23-06-2015

Russo, Juniper – How Acidic Is Yogurt?. <http://livewell.jillianmichaels.com/acidic-yogurt-5526.html>; consultado dia 11-09-2015

WEISS, Alison – The Magic of Microalgae, 2014. <http://solazyme.com/blog/2014/08/12/the-magic-of-microalgae/>; consultado dia 23-06-2015

7. Anexos

7.1 Anexo 1 – Metodologia

7.1.1 Preparação das Amostras



Figura 7.1.1 – Frascos de Vidro com iogurte suplementado com Espirulina.

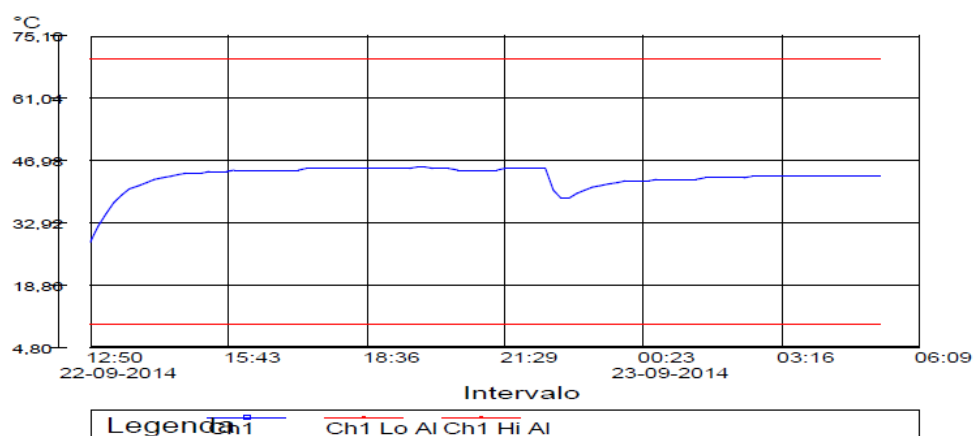


Figura 7.1.2 – Registo da variação da temperatura registada pela sonda introduzida na iogurteira.



Figura 7.1.3 – Armazenamento dos frascos de iogurte no frigorífico devidamente identificados, para posterior realização de análises.

7.1.2 Determinação do Teor de Proteína Bruta



Figura 7.1.4 – Digestor (Digestor 2006 Foss, Tecator Technology).



Figura 7.1.5 – Destilador (Foss, Kjeltec TM 2100, Tecator Technology).



Figura 7.1.6 – Solução após a titulação.

7.1.3 Determinação do Teor de Matéria Gorda

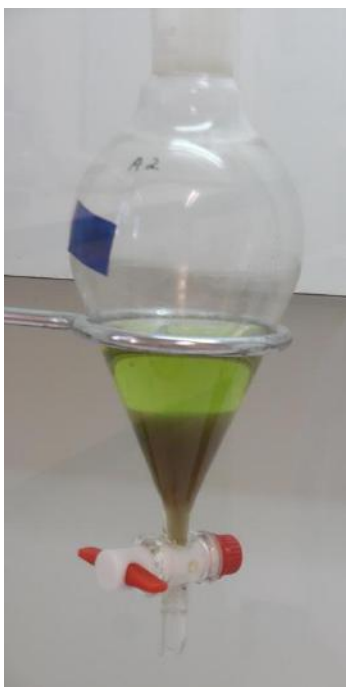


Figura 7.1.7 – Separação de fases ao fim de 30 minutos.



Figura 7.1.8 – Evaporação do éter no evaporador rotativo (Laborota 4000, Heidolph).

7.1.4 Determinação do Teor de Fibras

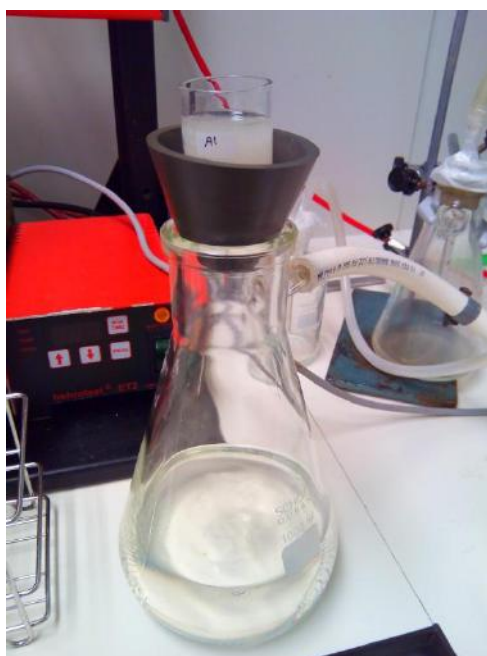


Figura 7.1.9 – Filtração num cadinho de goosh.

7.1.5 Determinação da Cinza Total



Figura 7.1.10 – Mufla (Controller B170, Nabertherm).

7.1.6 Determinação da Atividade Antioxidante



Figura 7.1.11 – Extratos para análise da atividade antioxidante provenientes do iogurte com alga (2 tubos falcon à esquerda) e do iogurte controlo (2 tubos falcon à direita).

7.1.7 Análise Sensorial

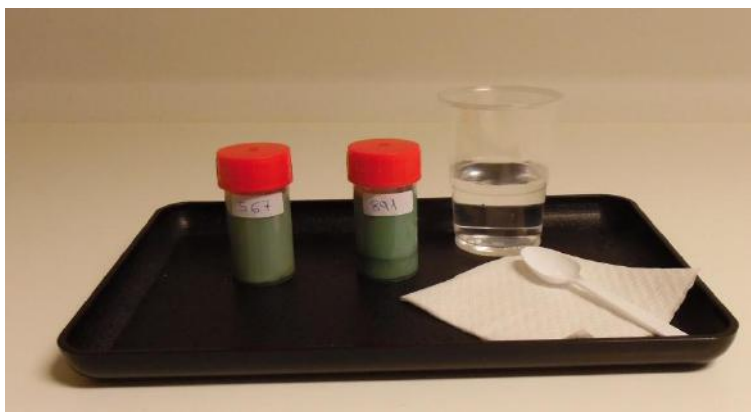


Figura 7.1.12 – Tabuleiro distribuído a cada provador na prova afetiva.

7.2 Anexo 2 – Determinação do Teor de Proteína Bruta

NORMA PORTUGUESA		12/10/2010 NP 1986 1991
Leites	Determinação do teor de proteína bruta. Técnica de Kjeldahl	
Laits	Détermination de la teneur en protéine brute. Technique de Kjeldahl	
Milks	Determination of protein content. Kjeldahl technique	
CDU	637.127:543	
Descritores	Leite; determinação de teores; proteínas; método de Kjeldahl; especificação do processo	
Correspondência		
Homologação	Diário da República, III Série, N.º 142, de 1991-06-24	
Elaborado por	Edição	
CT32 (IOA)	Novembro de 1991	
		© IOA reprodução proibida
Instituto Português da Qualidade		<small>Associação com o Tratado de Montreux 1991</small>

1. Objectivo e campo de aplicação

A presente Norma destina-se a fixar o método para o cálculo do teor de proteína bruta dos leites em natureza, de vaca, ovelha e cabra, inteiros, parcialmente desnatados e desnatados a partir do seu teor de azoto determinado segundo a técnica de Kjeldahl.

2. Referência

NP 402(1966)

Leite. Colheita das amostras.

3. Definição

Para os fins da presente Norma entende-se por teor de proteína bruta o resultado que se obtém multiplicando pelo factor 6,38 o teor de azoto, doseado segundo a técnica de Kjeldahl¹⁾.

4. Resumo do processo

Mineralização do azoto pelo ácido sulfúrico concentrado, em presença de um catalisador; alcalinização dos produtos da reacção; destilação e titulação do amoníaco libertado para obtenção do teor de azoto. Cálculo da proteína bruta multiplicando o teor de azoto pelo factor 6,38.

5. Reagentes

Todos os reagentes devem ser pró-análise.

A água utilizada deve ser destilada ou de pureza equivalente.

5.1. Ácido sulfúrico ($\rho_{20} = 1,84 \text{ g/cm}^3$).

5.2. Mistura catalisadora:

Sulfato de cobre ($\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) - 3 g

Óxido de titânio - 3 g

Ácido esteárico - 1 g

Sulfato de potássio - 93 g

5.3. Papel vermelho de tornesol.

5.4. Sacarose isenta de azoto.

5.5. Triptofano, fenacetina, cloreto ou dicloreto de lisina.

Ácido bórico - 4,0343 g.

5.6. Solução de ácido bórico, a 4% (m/V).

(A dissolução do ácido bórico deve ser feita com água quente.)

5.7. Solução de ácido clorídrico 0,1 N, ou de ácido sulfúrico 0,1 N.

5.8. Solução de hidróxido de sódio a 47% (m/m) - 704 g NaOH/dm^3 ou uma solução menos concentrada, por exemplo: 40% (m/m) - 572 g NaOH/dm^3 ou 30% (m/m) - 399 g NaOH/dm^3 .

5.9. Solução de indicador de pH

Dissolver 0,01 g de vermelho de metilo, 0,02 g de azul de bromotímolo e 0,06 g de verde de bromocresol em 100 cm^3 de álcool etílico a 95% (V/V).

A solução deve conservar-se em frasco escuro e lugar fresco.

¹⁾ Esta técnica pode ser executada em equipamento semiautomático.

NP 1986

1991

p. 4 de 6

6. Aparelhos e utensílios

Material corrente de laboratório, nomeadamente:

- 6.1. Aparelho de destilação por vapor ou aparelho de destilação corrente em vidro borossilicatado com adaptação perfeitamente estanque para balões de Kjeldahl e refrigerante.
- 6.2. Balança sensível ao décimo de miligrama.
- 6.3. Balões de Kjeldahl, de 500 a 800 cm³ de capacidade, munidos, se necessário, de uma rolha de vidro piriforme adaptada ao colo ou simples funil de vidro.
- 6.4. Banho de água, regulável para 30-40° C.
- 6.5. Bureta, de 50 cm³ graduada em décimos.
- 6.6. Dispositivo de aquecimento uniforme, no qual os balões de Kjeldahl possam ser aquecidos em posição inclinada (aproximadamente 45°), que não aqueça os balões acima do nível do seu conteúdo e munido de dispositivo colector de vapores.
- 6.7. Frascos de Erlenmeyer, de 200 cm³.
- 6.8. Potenciómetro.
- 6.9. Provetas, de 50 cm³ e de 200 cm³, graduadas em décimos.
- 6.10. Regularizador de ebulição, como, por exemplo, pequenos pedaços de porcelana, pedra-pomes, pérolas de vidro ou outros apropriados.

7. Colheita da amostra

Veja-se a NP 402.

8. Preparação da amostra

Aquece-se a amostra a $20 \pm 2^\circ \text{C}$ e agita-se cuidadosamente. Se não se obtiver uma dispersão homogénea da matéria gorda, aquece-se lentamente a amostra a 40°C , agita-se suavemente e arrefece-se a $20 \pm 2^\circ \text{C}$.

9. Técnica

9.1. Determinação

Devem efectuar-se duas determinações paralelas.

9.1.1. Mineralização

Introduzem-se em balão de Kjeldahl o regularizador de ebulição, 5 g da mistura catalisadora e 5 g de leite, pesados com a precisão de $\pm 0,001 \text{ g}$. Adicionam-se em seguida, cuidadosamente, 25 cm³ de ácido sulfúrico concentrado ou 30 cm³ no caso de leites com teor de matéria gorda maior que 5% (m/m). Mistura-se suavemente e coloca-se o balão em posição inclinada sobre o dispositivo de aquecimento. De início aquece-se moderadamente de modo que os fumos negros não atinjam o colo do balão.

Após o aparecimento de abundantes fumos brancos, aquece-se fortemente, agitando de vez em quando, até que o líquido esteja completamente límpido.

Prolonga-se a ebulição, mas moderada, durante pelo menos 1 h 30 min.

Deve ter-se em atenção o seguinte:

- a) o tempo necessário para que o conteúdo do balão fique completamente límpido não deve ultrapassar 1 h. O tempo de mineralização total não deve ser inferior a 2 h 30 min. Se for necessário mais de 1 h para a obtenção de limpidez, o tempo total de mineralização deve incluir esse acréscimo.

b) Se o volume residual de ácido sulfúrico for menor que 15 cm³ (aproximadamente) no final da mineralização, pode ter havido perda de azoto devido a sobreaquecimento. Para o evitar pode recorrer-se à colocação de anéis metálicos na parte inferior do balão, de modo que o foco calorífico apenas contacte a zona do balão abaixo do nível do conteúdo líquido.

9.1.2. Destilação

Deixa-se arrefecer o conteúdo do balão à temperatura ambiente e adicionam-se 300 cm³ de água, lavando cuidadosamente o colo do balão. Mistura-se o conteúdo, cuidadosamente, assegurando a dissolução total dos cristais entretanto formados. Deixa-se arrefecer. Para um frasco de Erlenmeyer medem-se, por proveta, 50 cm³ de solução de ácido bórico, juntam-se 4 gotas de solução do indicador, misturam-se e coloca-se o balão sob o refrigerante do aparelho de destilação, de tal maneira que a extremidade da alonga mergulhe na solução de ácido bórico. Medem-se por proveta 80 cm³ de soda cáustica para o balão de Kjeldahl, mantendo durante esta operação o balão inclinado, de tal maneira que a soda escorra ao longo da parede e os líquidos não se misturem. O volume total de água e hidróxido de sódio deve ser 370 cm³, de modo a permitir a recolha de aproximadamente 150 cm³ do destilado antes do

início da fervura irregular. Por exemplo se são adicionados 85 cm³ de hidróxido de sódio a 40% (m/m) ou 125 cm³ de hidróxido de sódio a 30% (m/m), o volume de água adicionado deve ser aproximadamente de 285 cm³ ou 245 cm³ de modo que o volume final não exceda 2/3 da capacidade total do balão. Liga-se imediatamente o balão de Kjeldahl ao refrigerante e aquece-se até à ebulição, evitando a formação de espuma. Regula-se depois o aquecimento de tal maneira que a ebulição dure, pelo menos, 30 min. Quando já foram recolhidos 100 a 125 cm³ do destilado, baixa-se o balão de Erlenmeyer até que a extremidade da alonga esteja aproximadamente 40 mm acima da marca de 200 cm³. Continua-se a destilação até ao início da fervura irregular.

A destilação do amoníaco terminará quando o papel vermelho de tornesol humedecido com água mude de cor com o líquido proveniente da extremidade da alonga. Para-se então imediatamente o aquecimento.

Se a destilação se considera incompleta, efectua-se nova determinação. Se está completa, desliga-se o aquecimento e lava-se a extremidade da alonga e as suas paredes interiores com água, recebendo os líquidos de lavagem no balão de recolha do destilado. Este ensaio deve efectuar-se em ambiente isento de amoníaco.

Titula-se o destilado com solução de ácido 0,1 N (5,7.) até que o pH seja

$4,6 \pm 0,1$ medido por potenciómetro.

9.2. Ensaio em branco

Efectua-se um ensaio em branco, utilizando 5 cm³ de água destilada em vez de leite e procedendo-se como em 9.1.

9.3. Ensaio de controlo

Deve testar-se periodicamente a fiabilidade da técnica do seguinte modo:

Para a mineralização, usam-se 0,20 g de triptofano, 0,35 g de fenacetina ou 0,20 g de cloreto de lisina.

Devem recuperar-se pelo menos 98 a 99% de azoto.

Para a destilação, usam-se 0,15 g de oxalato ou sulfato de amónio juntamente com 0,1 g de sacarose.

Devem recuperar-se entre 99 a 100% de azoto.

NP 1986

1991

p. 6 de 6

Resultados diferentes indicam falhas na técnica e/ou concentração imprecisa da solução de ácido (5.7).

10. Resultados

10.1 Cálculo

Sendo:

V_1 o volume, em centímetros cúbicos, da solução de ácido 0,1 N (5.7.) gasto na titulação do ensaio com leite;

V_2 o volume, em centímetros cúbicos, da solução de ácido 0,1 N (5.7.) gasto no ensaio em branco;

m a massa, em gramas, da toma do leite,

o teor de azoto total do leite, expresso em percentagem, é:

$$\frac{0,14 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

O teor de proteína bruta obtém-se multiplicando a percentagem de azoto pelo factor 6,38.

10.2. Apresentação

Os resultados apresentam-se com aproximação às milésimas para o azoto e com aproximação às centésimas para a proteína bruta.

10.3. Repetibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas, efectuadas pelo mesmo analista, não deve exceder 0,007 g de azoto por 100 g de leite.

11. Bibliografia

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists - 14ª edição, Washington, William Horwitz, 1984.

ISO 1871(1975) Agricultural food products. General directions for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method.

7.3 Anexo 3 – Determinação do Teor de Matéria Gorda

NORMA PORTUGUESA		NP 468 1990
Leites Determinação do teor da matéria gorda. Técnica de Röse-Gottlieb. Processo de referência		
Laits Détermination de la teneur en matière grasse. Technique de Röse-Gottlieb. Méthode de référence		
Milks Determination of fat content. Röse-Gottlieb method. Reference method		
CDU 637.1:543.2		
Descritores Leite; ensaios; determinação do teor de gordura; método de Röse-Gottlieb; definições; especificações do processo; reagentes em solução; equipamento de laboratório		
Correspondência ISO 1211 (1984), harmonizada		
Homologação Diário da República, III Série, N.º 260, de 1990-11-10		
Elaborado por CT32 (IPQ)		Edição Janeiro de 1991
		© IPO reprodução proibida
Instituto Português da Qualidade		22
		<small>Rua 5 de Novembro, Tarrafal 1099-001 LISBOA Tel: 212 24 81 00 Fax: 212 24 81 01</small>

1. Objectivo e campo de aplicação

A presente Norma destina-se a fixar o processo de referência para determinar o teor de matéria gorda do leite gordo, parcialmente desnatado e desnatado assim como dos leites de cabra e ovelha homogeneizados ou não, e do leite composto.

2. Referências

NP 402

Leite. Coheita das amostras

NP 403

Leites. Preparação das amostras para análise

3. Definição

Para os fins da presente Norma, entende-se por matéria gorda, o conjunto das substâncias extraídas por solventes orgânicos e determinadas ponderalmente segundo a técnica de Röse-Gottlieb.

4. Resumo do processo

Extracção da matéria gorda por solventes apropriados, evaporação dos solventes e pesagem do residuo obtido.

5. Reagentes

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica. A água utilizada deve ser destilada ou de pureza equivalente.

5.1. Álcool etílico a 96 ± 2 % (V/V)

5.2. Éter etílico, isento de peróxidos e de residuo

NOTA 1: Verifica-se se o éter etílico contém peróxidos, adicionando a 10 cm³ de éter etílico, contido numa pequena proveta munida de rolha de vidro e previamente limpa com um pouco deste solvente, 1 cm³ de uma solução a 10 % (m/V) de iodeto de potássio preparada recentemente. Agita-se e deixa-se em repouso durante 1 min. Não deve aparecer coloração amarela em qualquer das duas camadas.

NOTA 2: O éter etílico pode tornar-se e manter-se isento de peróxidos por adição de folhas de zinco previamente imersas durante 1 min numa solução contendo 10 g de sulfato de cobre (Cu SO₄ 5H₂ O) e 2 cm³ de ácido sulfúrico por dm³ e depois lavadas com água. Para 1 dm³ de éter adiciona-se uma folha de zinco com cerca de 30 cm², cortada em tiras suficientemente longas para atingir, pelo menos, metade da altura do recipiente.

O éter etílico só deverá ser utilizado pelo menos três dias após a adição da folha de zinco tratada.

5.3. Éter de petróleo, isento de residuo, com ponto de ebulição entre 30 e 60° C.

5.4. Hidróxido de amónio a 25 % (m/m) ($\rho_{20} = 0,910$ g/cm³).

5.5. Mistura em partes iguais de éter etílico (5.2) e de éter de petróleo (5.3), preparada pouco tempo antes da utilização.

5.6. Solução de vermelho «Congo» a 1 % (m/V).

6. Aparelhos e utensílios

Material corrente de laboratório e nomeadamente:

6.1. Aparelho de extracção, tipo Mojonnier, munido de rolha de vidro esmerilado, de cortiça de boa qualidade ou de outros dispositivos de vedação inalteráveis

NP 468

1990

p. 4 de 10

pelos solventes utilizados (fig. 1).

NOTA: As rolhas de cortiça devem ser tratadas pelo éter etílico, depois pelo éter de petróleo e em seguida imersas em água, no mínimo a 60° C, pelo menos durante 20 min. Deixam-se permanecer na água durante o arrefecimento para que estejam saturadas no momento da utilização.

6.2. Balança sensível a 0,0001 g.

6.3. Balão de fundo plano e colo esmerilhado de 250 cm³.

6.4. Banho de água com aquecimento eléctrico e termóstato regulável para 60 a 70° C.

6.5. Centrífuga de motor anti-deflagrante, regulável para 500 a 600 r.p.m.

6.6. Estufa de secagem, regulável para 102 ± 2° C.

6.7. Provetas de 5, 10 e 25 cm³ graduadas em centímetros cúbicos.

7. Colheita das amostras

Veja-se a NP 402

8. Preparação da amostra

Veja-se a NP 403

9. Técnica

9.1. Ensaio em branco

Efectua-se, em paralelo com a determinação, um ensaio em branco com 10 cm³ de água, utilizando o mesmo tipo de aparelho de extração, os mesmos reagentes, nas mesmas proporções e o mesmo modo operativo (9.2).

Se o resultado do ensaio em branco for superior a 0,5 mg, os reagentes devem ser verificados.

9.2. Determinação

Pesa-se directa ou indirectamente, com aproximação ao 0,001 g, para o aparelho de extração (5.1), uma toma de 10 cm³ de leite. Adiciona-se 2 cm³ de hidróxido de amónio e mistura-se. Adiciona-se 10 cm³ de álcool etílico, rolha-se e mistura-se com cuidado.

Adiciona-se 25 cm³ de éter etílico, rolha-se o aparelho de extração com rolha molhada e agita-se energeticamente durante 1 min, invertendo-o várias vezes.

Arrefece-se, se necessário, sob água corrente para evitar a formação de emulsões.

Retira-se a rolha com cuidado, adiciona-se 25 cm³ de éter de petróleo, utilizando os primeiros cm³ para lavar a rolha e o interior do colo do aparelho. Rolha-se e agita-se suavemente durante 30 s, invertendo o tubo.

Deixa-se em repouso até separação nítida das camadas éteres e aquosa ¹⁾.

Pode acelerar-se a separação perfeita dos líquidos utilizando a centrífuga.

Retira-se a rolha do aparelho e lava-se com alguns cm³ da mistura de solventes.

Transfere-se a camada superior para o balão de 250 cm³ previamente seco em estufa e tarado depois de arrefecido.

Adiciona-se 5 cm³ de álcool etílico ao conteúdo do aparelho e procede-se a mais

¹⁾ Para facilitar a visibilidade da linha de separação entre as camadas etérea e aquosa pode adicionar-se duas gotas de uma solução de vermelho «Congo» (5.6) ou de outro corante hidrossolúvel que não altere os resultados.

24

duas extracções como anteriormente mas usando apenas 15 cm³ de éter etílico e 15 cm³ de éter de petróleo. No caso de leite magro não é necessário efectuar a terceira extracção.

Destila-se a maior parte da mistura etérea, evapora-se a restante em banho de água e seca-se em estufa por períodos sucessivos de uma hora até que duas pesagens sucessivas não difiram mais de 0,5 mg ou haja ligeiro aumento de massa.

Neste último caso considera-se nos cálculos o valor da pesagem a que corresponde a menor massa.

Adiciona-se 15 a 20 cm³ de éter de petróleo para verificar se a matéria extraída é totalmente solúvel. Para isso aquece-se ligeiramente o balão e agita-se com cuidado. Se a matéria extraída não for totalmente solúvel no éter de petróleo, extrai-se completamente a matéria gorda contida no balão por sucessivas lavagens com éter de petróleo quente, deixando depositar a matéria não solúvel antes de cada decantação.

Repete-se três vezes esta operação utilizando o éter de petróleo para lavar o interior do colo do balão. Lava-se em seguida o exterior do colo do balão com a mistura de solventes. Seca-se o balão, por períodos sucessivos de uma hora, em estufa, até que duas pesagens sucessivas não difiram mais de 0,5 mg ou haja ligeiro aumento de massa. Neste último caso considera-se nos cálculos o valor da pesagem a que corresponde a menor massa.

10. Resultados

10.1. Cálculo

Sendo:

A o balão que contém as extracções da matéria gorda; -

B o balão utilizado no ensaio em branco;

m₀ a massa, em gramas, da toma de leite;

m₁ a massa, em gramas, do balão A e da matéria extraída, após secagem;

m₂ a massa, em gramas, do balão A após secagem, ou, em caso de matérias não solúveis, do balão A e das matérias não solúveis, após secagem;

m₃ a massa, em gramas, do balão B e de alguma matéria extraída, após secagem;

m₄ a massa, em gramas, do balão B, após secagem ou, em caso de matérias não solúveis, do balão B e das matérias não solúveis, após secagem;

o teor de matéria gorda, expresso em percentagem em massa, do leite é:

$$\frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m_0} \times 100$$

Toma-se como resultado a média aritmética de duas determinações sobre a mesma amostra que obedeam às condições de repetibilidade (10.3).

10.2. Apresentação

Os resultados apresentam-se com aproximação às centésimas.

10.3. Repetibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas simultaneamente

sobre a mesma amostra e pelo mesmo analista não deve exceder os valores seguintes:

- para o leite com o teor de matéria gorda superior ou igual a 0,5 % (m/m): 0,02 g de matéria gorda por 100 g de produto.

NP 468

1990

p. 6 de 10

- para o leite com o teor de matéria gorda inferior a 0,5% (m/m): 0,01 g de matéria gorda por 100 g de produto.

10.4. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas em dois laboratórios diferentes, sobre a mesma amostra, não deve exceder os valores seguintes:

- para o leite com o teor de matéria gorda superior a 0,3% (m/m): 0,04 g de matéria gorda por 100 g de produto.

- para o leite com o teor de matéria gorda inferior a 0,3% (m/m): 0,02 g de matéria gorda por 100 g de produto.

11. Referência à normalização internacional



Esta Norma baseia-se na Norma Internacional ISO 1211 (1984) «Lait. Détermination de la teneur en matière grasse. Méthode gravimétrique (Méthode de référence)», à qual é equivalente.

26

7.4 Anexo 4 – Determinação da Acidez

ORIGINAL

CDU 637.123:541.132.3

NORMA PORTUGUESA	LEITES Determinação da acidez	NP-470 1983
Leits. Détermination de l'acidité.		
<p>1 - OBJECTIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO</p> <p>A presente Norma destina-se a fixar o processo para determinar a acidez do leite e dos leites compostos, assim como dos leites de cabra e de ovelha.</p> <p>2 - REFERÊNCIAS</p> <p>NP-402 - Leite. Colheita das amostras. NP-403 - Leite. Preparação das amostras para análise.</p> <p>3 - DEFINIÇÃO</p> <p>Entende-se por acidez dum leite o volume de solução alcalina normal, expresso em centímetros cúbicos, necessário para neutralizar 1 dm³ de leite.</p> <p>4 - RESUMO DO PROCESSO</p> <p>Neutralização dos ácidos livres contidos no leite, por solução alcalina titulada.</p> <p>5 - REAGENTES</p> <p>A água utilizada deve ser destilada ou desmineralizada, isenta de dióxido de carbono por ebulição durante 10 minutos e arrefecida, tapada, antes da sua utilização.</p> <p>5.1 - Solução alcoólica de fenolftaleína a 0,2g em 100cm³ de álcool etílico a 95% (V/V) previamente neutralizado. <i>0,2 + 24g</i></p> <p>5.2 - Solução de hidróxido de sódio 0,1N. <i>4,0984g</i></p>		
DR.III* Serie, Nº 236 de 1983-10-13	 COTA: _____	(Continua)  CT-32

DIRECÇÃO - GERAL DA QUALIDADE (DGO) - Rua José Estevão, 83 A - 1198 Lishos Cordeis

REPRODUÇÃO PROIBIDA

Edição Dez. 1983

6 - APARELHOS E UTENSÍLIOS

6.1 - Agitador magnético.

6.2 - Bureta de precisão graduada em décimos de centímetro cúbico.

6.3 - Copo de precipitação de 50cm³ (NP-183).

6.4 - Frasco de Erlenmeyer de 100cm³ (NP-183).

6.5 - Pipetas de precisão de 10cm³ (NP-183).

6.6 - Potenciômetro com eléctrodo de vidro e um eléctrodo de referência apropriado calibrado por meio de soluções tampão de pH 6 e pH 9 com precisão de $\pm 0,01$.

7 - COLHEITA DAS AMOSTRAS

Veja-se a NP-402.

8 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Veja-se a NP-403.

9 - TÉCNICA

9.1 - DETERMINAÇÃO

9.1.1 - Para o frasco de Erlenmeyer, mede-se com a pipeta de precisão 10cm³ de leite. Adicionam-se seis gotas da solução alcoólica de fenolftaleína e titula-se com solução de hidróxido de sódio 0,1N, contida na bureta de precisão até viragem do indicador.

9.1.2 - No caso de dificuldade de observação da viragem do indicador, procede-se do seguinte modo:

Mede-se com pipeta de precisão 20cm³ de leite para o copo de precipitação. Introduzem-se os eléctrodos do potenciômetro no leite e titula-se com solução de hidróxido de sódio 0,1N, contida na bureta de precisão, até que o pH medido pelo potenciômetro atinja o valor de 8,3. Durante a titulação, o leite deve ser agitado constantemente por meio de agitador magnético.

(Continua)

10 - RESULTADOS

10.1 - CÁLCULO

Sendo:

V o volume, expresso em centímetros cúbicos, da solução de hidróxido de sódio 0,1N, gasto na titulação,

a acidez do leite, expressa em centímetros cúbicos de solução alcalina normal por decímetro cúbico, é:

10.1.1 - Segundo a técnica descrita em 9.1.1 - 10 V

10.1.2 - Segundo a técnica descrita em 9.1.2 - 5 V

10.2 - APRESENTAÇÃO


Os resultados apresentam-se com aproximação às unidades.

11 - BIBLIOGRAFIA

ISO 6091- 1980 - Lait sec. Détermination d'acidité titrable. (Méthode de référence).



7.5 Anexo 5 – Determinação da Cinza Total

CDU 637.1:543.2		ORIGINAL
NORMA PORTUGUESA	LEITES Determinação da cinza total	NP-477 1983
Laits. Détermination de la cendre totale.		
<p>1 - OBJECTIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO</p> <p>A presente Norma destina-se a fixar o processo para determinar a cinza total do leite e dos leites compostos, assim como dos leites de ovelha e de cabra.</p> <p>2 - REFERÊNCIAS</p> <p>NP-402 - Leite. Colheita das amostras.</p> <p>NP-403 - Leite. Preparação das amostras para análise.</p> <p>3 - DEFINIÇÃO</p> <p>Para os fins da presente Norma, entende-se por cinza total dum leite, o resíduo mineral obtido por incineração segundo o processo a seguir descrito.</p> <p>4 - RESUMO DO PROCESSO</p> <p>Evaporação do leite à secura. Calcinação do resíduo a 450°C e respectiva pesagem.</p> <p>5 - REAGENTE</p> <p>Ácido acético glacial.</p> <p>6 - APARELHOS E UTENSÍLIOS</p> <p>6.1 - Balança sensível ao 0,1mg.</p> <p>6.2 - Banho-maria.</p>		
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">DIRECÇÃO - GERAL DA QUALIDADE (D.G.Q.) - Rua José Estevão, 83-A - 1198 Lisboa Codex</p>		(Continua)
DR. IIIª Série, N.º 236 de 1983-10-13		CT-32
REPRODUÇÃO PROIBIDA		

6.3 - Cápsula de platina ou outra apropriada de, pelo menos, 25cm³.

6.4 - Copo de precipitação.

6.5 - Estufa de secagem, regulável para 105 ± 5°C.

6.6 - Exsicador com substância exsicante ativada e com indicador de humidade.

6.7 - Funil.

6.8 - Mufla com pirómetro.

6.9 - Pipeta de 25cm³.

7 - COLHEITA DAS AMOSTRAS

Veja-se a NP-402.

8 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Veja-se a NP-403.

9 - TÉCNICA

Para cápsula tarada após calcinação e arrefecimento em exsicador, medem-se 25cm³ de leite.

Pesa-se com a precisão de 1mg e evapora-se, no banho-maria, até à secura, depois de prévia adição de algumas gotas de ácido acético, para impedir a formação de uma película à superfície do leite.

Carboniza-se, lentamente, o resíduo à chama e calcina-se em mufla a temperatura que não exceda a do rubro sombrio (450°).

Após a calcinação, deixa-se arrefecer em exsicador e pesa-se.

(Continua)

10 - RESULTADOS

10.1 - CÁLCULO

Sendo:

m_1 - a massa da toma dos 25cm³ de leite, expressa em gramas;

m_2 - a massa da cinza, expressa em gramas,

a cinza total do leite expressa em percentagem é:

$$\frac{m_2}{m_1} \times 100$$

10.2 - APRESENTAÇÃO

Os resultados apresentam-se com aproximação às décimas.

11 - REPETIBILIDADE

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas simultaneamente, sobre a mesma amostra é pelo mesmo operador não deve exceder 0,01g por 100g de leite.

12 - BIBLIOGRAFIA

NP V 04-208 (1979) Lait. Détermination des cendres.



7.6 Anexo 6 – Microrganismos Totais (Aeróbios e Anaeróbios) a 20°C

INTERNATIONAL
STANDARD

ISO
4833

Third edition
2003-02-01

**Microbiology of food and animal feeding
stuffs — Horizontal method for the
enumeration of microorganisms —
Colony-count technique at 30 °C**

*Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le
dénombrement des micro-organismes — Technique de comptage des
colonies à 30 °C*



Reference number
ISO 4833:2003(E)

© ISO 2003

Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Colony-count technique at 30 °C

1 Scope

This International Standard specifies a horizontal method for the enumeration of microorganisms, by counting the colonies growing in a solid medium after aerobic incubation at 30 °C. Subject to the limitations discussed in the introduction, this International Standard is applicable to products intended for human consumption or the feeding of animals.

The applicability of this International Standard to the examination of certain fermented food and animal feeding stuffs is limited. For the examination of fermented food and animal feeding stuffs, other media and/or incubation conditions might be more appropriate.

2 Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO 6887 (all parts), *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*

ISO 7218:1996, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General rules for microbiological examinations*

ISO 8261, *Milk and milk products — General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination*

ISO/TS 11133-1, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory*

3 Term and definition

For the purposes of this document, the following term and definition applies.

3.1

microorganism

bacteria, yeast and mould-forming countable colony, produced under the conditions specified in this International Standard

4 Principle

4.1 Two poured plates are prepared using a specified culture medium and a specified quantity of the test sample, if the initial product is liquid, or using a specified quantity of an initial suspension in the case of other products.

Other pairs of poured plates are prepared, under the same conditions, using decimal dilutions of the test sample or of the initial suspension.

4.2 The plates are aerobically incubated at 30 °C for 72 h.

4.3 The number of microorganisms per millilitre or per gram of sample is calculated from the number of colonies obtained on selected plates (see Clause 10).

5 Culture media and diluents

For current laboratory practice, see ISO 7218 and ISO/TS 11133-1.

5.1 Diluents

See the relevant part of ISO 6887.

5.2 Plate count agar (PCA)

5.2.1 Composition

Enzymatic digestion of casein	5,0 g
Yeast extract	2,5 g
Glucose, anhydrous (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1,0 g
Agar ¹⁾	9 g to 18 g
Water	1 000 ml

When dairy products are examined, add 1,0 g of skimmed milk powder per litre of the culture medium. The skimmed milk powder shall be free from inhibitory substances.

5.2.2 Preparation

5.2.2.1 Preparation from commercial dehydrated complete medium

Follow the manufacturer's instructions and add, if necessary, the skimmed milk powder (see 5.2.1).

Adjust the pH, if necessary, so that after sterilization it is $7,0 \pm 0,2$ at 25 °C.

5.2.2.2 Preparation from dehydrated basic components

Dissolve and disperse in the water, in the following order: the yeast extract, the enzymatic digestion of casein, the glucose and, if necessary, the skimmed milk powder. Heating the water will assist this procedure.

Add the agar and heat to boiling, stirring frequently until the agar is completely dissolved.

1) Depending on the gel strength of the agar.

Adjust the pH, if necessary, so that after sterilization it is $7,0 \pm 0,2$ at 25 °C.

5.2.2.3 Distribution, sterilization and storage

Dispense the medium into test tubes (6.8), in quantities of 12 ml to 15 ml per tube, or into flasks or bottles (6.8) of capacity not greater than 500 ml.

Sterilize in an autoclave at 121 °C for 15 min.

If the medium is to be used immediately, cool it to 44 °C to 47 °C in a water bath (6.5) before use. If not, store it in the dark at a temperature of $3 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ for no longer than 3 months, under conditions which do not allow any change in its composition and properties.

Before beginning the microbiological examination, in order to avoid any delay when pouring the medium, completely melt the medium, then cool it to 44 °C to 47 °C in a water bath (6.5) before use.

In order to check the temperature of the agar, it is recommended to place a thermometer into a portion of 15 g/l agar control solution in a separate container identical to that used for the medium. The temperature control solution should be exposed to the same heating and cooling operations as the medium itself.

5.2.3 Performance testing for the quality assurance of the culture medium

To test the performance of the medium, see ISO/TS 11133-1.

5.3 Overlay medium (if necessary, see 9.2.7)

5.3.1 Composition

Agar ¹⁾	12 g to 18 g
Water	1 000 ml

5.3.2 Preparation

Add the agar to the water and heat to boiling, stirring frequently until the agar is completely dissolved, or steam for about 30 min.

Adjust the pH, if necessary, so that after sterilization it is $7,0 \pm 0,2$ at 25 °C.

5.3.3 Distribution, sterilization and storage

Dispense the medium into test tubes (6.8) in quantities of 4 ml per tube, or into flasks or bottles (6.8) of appropriate capacity.

Sterilize in an autoclave at 121 °C for 15 min.

If the medium is to be used immediately, cool it to 44 °C to 47 °C in a water bath (6.5) before use. If not, store it in the dark at a temperature of $3 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ for no longer than 3 months, under conditions which do not allow any change in its composition and properties.

Before beginning the microbiological examination, in order to avoid any delay when pouring the medium, completely melt the medium, then cool it to 44 °C to 47 °C in a water bath (6.5) before use.

6 Apparatus and glassware

Disposable glassware is an acceptable alternative to re-usable glassware if it has suitable specifications.

Usual microbiological laboratory equipment and, in particular, the following.

6.1 Apparatus for dry sterilization (oven) or wet sterilization (autoclave)

See ISO 7218.

6.2 Incubator, capable of operating at $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.3 Petri dishes, made of glass or plastic, 90 mm to 100 mm in diameter.

6.4 Pipettes, of nominal capacity 1 ml.

6.5 Water bath, capable of operating at 44°C to 47°C .

6.6 Colony-counting equipment, for example, consisting of an illuminated base with a dark background, fitted with magnifying lens of suitable magnification of about $1,5 \times$ may be used and a mechanical or electronic digital counter.

6.7 pH-meter, having an accuracy of calibration of $\pm 0,1$ pH unit at 25°C .

6.8 Test tubes, flasks or bottles, of appropriate capacity and not greater than 500 ml.

7 Sampling

It is important that the laboratory receive a sample which is truly representative and has not been damaged or changed during transport or storage.

Sampling is not part of the method specified in this International Standard. See the specific International Standard dealing with the product concerned. If there is no specific International Standard, it is recommended that the parties concerned come to an agreement on this subject.

8 Preparation of test sample

Prepare the test sample in accordance with the relevant part of ISO 6887, or ISO 8261, and the specified standard dealing with the product concerned. If there is no specific International Standard, it is recommended that the parties concerned come to an agreement on this subject.

9 Procedure

9.1 Test portion, initial suspension and dilutions

See the relevant part of ISO 6887 and the specific International Standard dealing with the product concerned.

9.2 Inoculation and incubation

9.2.1 Take two sterile Petri dishes (6.3). Transfer to each dish, by means of a sterile pipette (6.4) 1 ml of the test sample, if liquid, or 1 ml of the initial suspension in the case of other products (10^{-1} dilution).

9.2.2 Take two other sterile Petri dishes (6.3). Transfer to each dish, by means of another sterile pipette (6.4), 1 ml of the 10^{-1} dilution (liquid product) or 1 ml of the 10^{-2} dilution (other products).

9.2.3 If necessary, repeat the procedure with the further dilutions, using a new sterile pipette for each decimal dilution.

9.2.4 If appropriate and possible, select only the critical dilutions steps (at least two consecutive decimal dilutions) for the inoculation of the Petri dishes that will give colony counts of between 15 and 300 colonies per plate.

9.2.5 Pour about 12 ml to 15 ml of the plate count agar (5.2) at 44 °C to 47 °C into each Petri dish. The time elapsing between the end of the preparation of the initial suspension (or of the 10⁻¹ dilution if the product is liquid) and the moment when the medium (5.2) is poured into the dishes shall not exceed 45 min.

9.2.6 Carefully mix the inoculum with the medium by rotating the Petri dishes and allow the mixture to solidify by leaving the Petri dishes standing on a cool horizontal surface.

9.2.7 After complete solidification, and only in the case where it is suspected that the product under examination contains microorganisms whose colonies will overgrow the surface of the medium, pour about 4 ml of the overlay medium (5.3) at 44 °C to 47 °C onto the surface of the inoculated medium. Allow to solidify as described above.

9.2.8 Invert the prepared dishes and place them in the incubator (6.2) at 30 °C ± 1 °C for 72 h ± 3 h. Do not stack the dishes more than six high. Stacks of dishes should be separated from one another and from the walls and top of the incubator.

9.3 Counting of colonies

9.3.1 After the specified incubation period (9.2.8), count the colonies on the plates (10.1), using the colony-counting equipment (6.6) if necessary. Examine the dishes under subdued light. It is important that pinpoint colonies should be included in the count, but it is essential that the operator avoid mistaking particles of undissolved or precipitated matter in dishes for pinpoint colonies. Examine doubtful objects carefully, using higher magnification where required, in order to distinguish colonies from foreign matter.

9.3.2 Spreading colonies shall be considered as single colonies. If less than one-quarter of the dish is overgrown by spreading, count the colonies on the unaffected part of the dish and calculate the corresponding number of the entire dish. If more than one-quarter is overgrown by spreading colonies, discard the count.

10 Expression of results

10.1 Method of calculation

See Amendment 1 to ISO 7218:1996.

10.2 Precision

10.2.1 General

The precision data were evaluated for dishes containing more than 15 and fewer than 300 colonies. The precision data depend on the flora association and the sample matrix. The data presented are derived from collaborative studies (see references [1], [2] and [3]) and are valid for raw and pasteurized milk. They may be used as estimates when colony counts in other products are determined.

10.2.2 Repeatability

The absolute difference between two independent single test results, obtained using the same method on identical test material in the same laboratory by the same operator using the same equipment within a short interval of time, should not be greater than the repeatability limit, $r = 0,25$, in log₁₀ microorganisms per millilitre (corresponding to 1,8 on the normal scale in microorganisms per millilitre).

ISO 4833:2003(E)

NOTE This repeatability limit was derived from collaborative studies for raw and pasteurized milk (see references [1], [2] and [3]) and may be used for such products.

10.2.3 Reproducibility

The absolute difference between two single test results, obtained using the same method on identical test material in different laboratories with different operators using different equipment, should not be greater than the reproducibility limit, $R = 0,45$, in \log_{10} microorganisms per millilitre (corresponding to 2,8 on the normal scale in microorganisms per millilitre).

NOTE This reproducibility limit was derived from collaborative studies for raw and pasteurized milk (see references [1], [2] and [3]) and may be used for such products.

10.3 Interpretation of test results

In the following examples, the average precision data, a probability level of 95 % and the analysis of one sample are considered. It should be noted that, under practical conditions, the average of several samples is often used. The figures are indicated in microorganisms per millilitre.

a) Repeatability conditions

First result: $10^5 = 100\ 000$

The difference between the first and the second result should not be greater than $0,25 \log_{10}$ units.

Second result: $\log 10^{4,75} = 56\ 000$ or

$\log 10^{5,25} = 178\ 000$

The difference between the first and the second result is acceptable if the second result is not lower than 56 000 or not higher than 178 000.

b) Reproducibility conditions

Results obtained in the first laboratory (average of duplicate determination): $10^5 = 100\ 000$

The difference between the first and the second result obtained in the second laboratory should not be greater than $0,45 \log_{10}$ units:

Second results: $\log 10^{4,55} = 36\ 000$, or

$\log 10^{5,45} = 280\ 000$

The difference between the results obtained by the first and the second laboratory is acceptable, if the second laboratory obtains a result which is not lower than 36 000 and not higher than 280 000.

Annex A shows the calculation and use of the critical difference (CD) to interpret results.

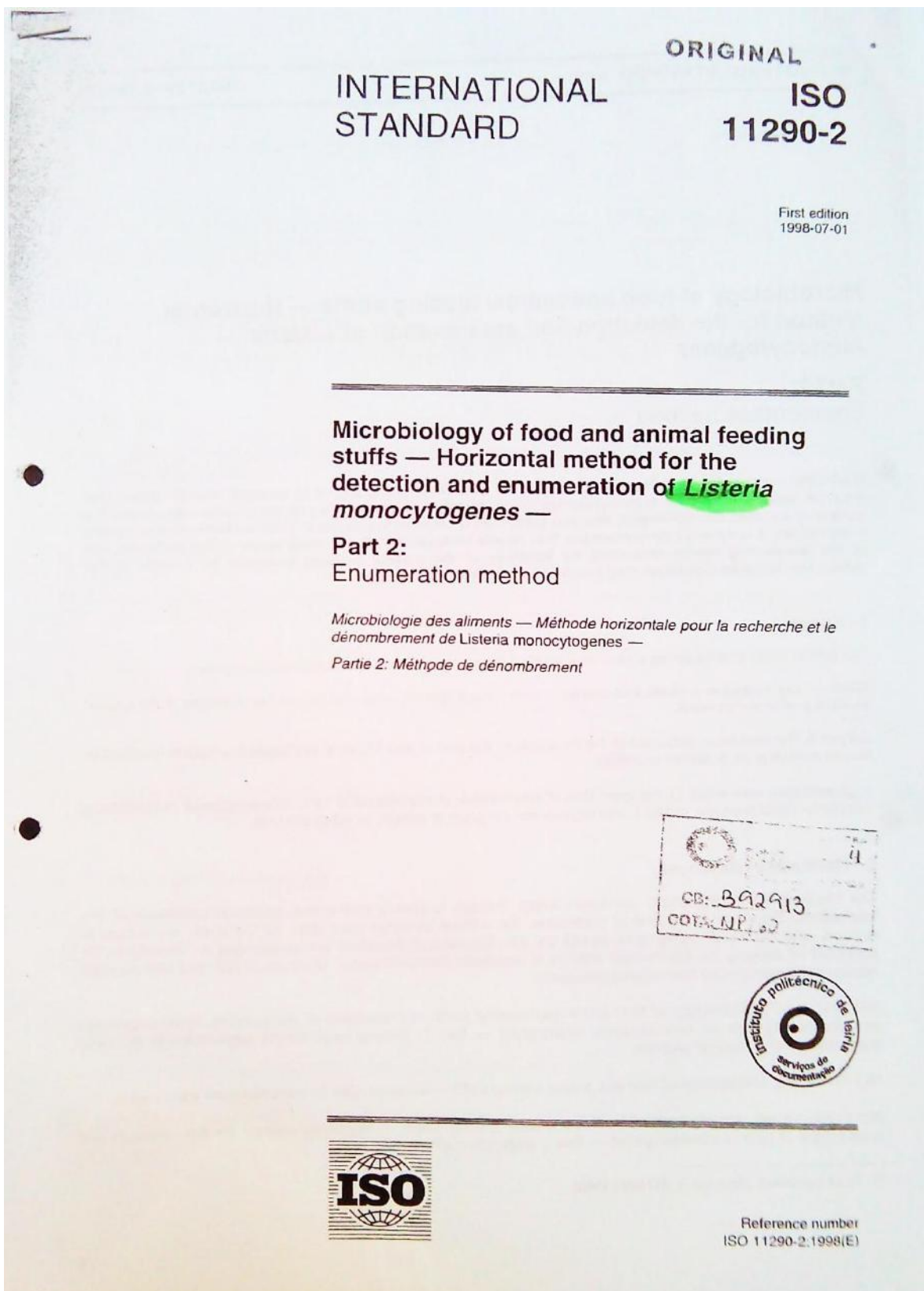
10.4 Confidence limits

See ISO 7218.

Bibliography

- [1] PITON, C., GRAPPIN, R. A model for statistical evaluation of precision parameters of microbiological methods: Application to dry rehydratable film methods and IDG reference methods for enumeration of total aerobic mesophilic flora and coliforms in raw milk. *J. AOAC*, **74**, 1991, pp. 92-103
- [2] SCOTTER, S., ALDRIDGE, M., BACK, J., WOOD, R. Validation of European Community methods for microbiological and chemical analysis of raw and heat-treated milk. *J. Assoc. Publ. Analyst.*, **29**, 1993, pp. 1-32
- [3] DAHMS, S., WEISS, H. Estimation of precision values for microbiological reference methods: Standardized pour plate technique. *Milchwiss.*, **53**, 1988, pp. 555-559

7.7 Anexo 7 – *Listeria monocytogenes*



Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* —

Part 2: Enumeration method

WARNING — In order to safeguard the health of laboratory personnel, it is strongly recommended that tests for detecting *Listeria monocytogenes* are undertaken in properly equipped laboratories, under the control of a skilled microbiologist, and that great care is taken in the disposal of all contaminated materials. In particular, it is strongly recommended that female laboratory staff are made aware of the particular risk to the developing foetus presented by infection of the mother through exposure to *Listeria monocytogenes*. National legislation may involve more specific demands.

1 Scope

This part of ISO 11290 specifies a horizontal method for the enumeration of *Listeria monocytogenes*.

NOTE — The method also allows enumeration of other *Listeria* species which may be used as indicators of the hygienic quality of food or feed products.

Subject to the limitations discussed in the introduction, this part of ISO 11290 is applicable to products intended for human consumption or animal foodstuffs.

In general (see note in 9.2.1), the lower limit of enumeration of this method is 10 *L. monocytogenes* per millilitre of sample for liquid products, or 100 *L. monocytogenes* per gram of sample for other products.

2 Normative references

The following standards contain provisions which, through reference to the text, constitute provisions of this International Standard. At the time of publication, the editions indicated were valid. All Standards are subject to revision, and parties to agreements based on this International Standard are encouraged to investigate the possibility of applying the most recent editions of standards indicated below. Members of IEC and ISO maintain registers of currently valid International Standards.

ISO 6887-1:—¹⁾, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and of decimal dilutions.*

ISO 7218:1996, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General rules for microbiological examination.*

ISO 11290-1:1996, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* — Part 1: Detection method.*

1) To be published. (Revision of ISO 6887:1993)

2 Definitions

For the purposes of this part of ISO 11290, the following definitions apply.

3.1

Listeria monocytogenes

microorganisms which form typical colonies on the solid selective medium described and which display the microbiological, physiological and biochemical characteristics described when the analysis is carried out in accordance with this part of ISO 11290

3.2

enumeration of *Listeria monocytogenes*

determination of the number of colony-forming units (CFU) of *Listeria monocytogenes* (see 3.1), in a given quantity of product, when the analysis is carried out in accordance with this part of ISO 11290

4 Principle

Within the limits of this part of ISO 11290, the enumeration of *Listeria monocytogenes* requires six successive steps (see annex A for a flowchart).

4.1 Preparation of the initial suspension in one of the two diluents described, as necessary.

4.2 Resuscitation for 1 h at 20 °C.

4.3 Surface plating, on the solid selective culture medium contained in two Petri dishes, of a specified quantity of the test sample for liquid products or the initial suspension for other products.

Preparation of other dishes, under the same conditions, using decimal dilutions of the test sample or initial suspension.

4.4 Incubation of the dishes at 35 °C or 37 °C and examination after 24 h and 48 h.

4.5 Confirmation of presumptive colonies of *Listeria monocytogenes* with the tests described.

4.6 From the number of confirmed colonies, calculation of the number of *Listeria monocytogenes* per gram or per millilitre of the test sample.

5 Culture media and reagents

For current laboratory practice, see ISO 7218.

NOTE — Because of the large number of culture media and reagents, it has been considered preferable, for clarity of the text, to describe them in annex B.

6 Apparatus and glassware

Usual microbiological equipment (see ISO 7218) and, in particular, the following.

6.1 Apparatus for dry sterilization (oven) or wet sterilization (autoclave)

See ISO 7218.

- 6.2 **Drying cabinet or incubator**, capable of being maintained between $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6.3 **Incubators**, for maintaining the inoculated media, plates and tubes within the following temperature ranges:
- $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (optional);
 - $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (optional);
 - $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ or $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6.4 **Water bath**, capable of being maintained at $47\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6.5 **Loops and wires** of platinum/iridium or nickel/chromium, or **Pasteur pipettes** or **single-use loops**.
- 6.6 **Glass or plastic spreaders**, sterile.
- 6.7 **pH-meter**, capable of being read to the nearest 0,01 pH unit at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, enabling measurements to be made which are accurate to $\pm 0,1$ pH unit.
- 6.8 **Test tubes or flasks**, of appropriate capacity, for sterilization and storage of culture media and incubation of liquid media.
- 6.9 **Total-delivery graduated pipettes**, of nominal capacities 1 ml and 10 ml, graduated respectively in 0,1 ml and 0,5 ml divisions.
- 6.10 **Petri dishes**, of diameter 90 mm and 140 mm.
- 6.11 **Jars**, suitable for microaerobic incubation (optional).
- 6.12 **Gas mixture** (optional), of specified composition for microaerobic incubation:
5 % to 12 % CO_2 , 5 % to 15 % O_2 , and N_2 up to 100 %.
- 6.13 **Equipment for the Henry illumination test** (optional)
See annex B.
- 6.14 **Microscope**, preferably with phase-contrast.

7 Sampling

Sampling is not part of the method specified in this part of ISO 11290. If there is no specific International Standard dealing with sampling of the product concerned, it is recommended that the parties concerned come to an agreement on this subject.

It is important that the laboratory receive a sample which is truly representative and has not been damaged or changed during transport or storage (see ISO 7218).

■ Preparation of test sample

Prepare the test sample in accordance with the specific International Standard appropriate to the product concerned. If there is no specific International Standard, it is recommended that the parties concerned come to an agreement on this subject.

9 Procedure

WARNING — Whenever a choice is given between 35 °C or 37 °C for the incubation temperature, this temperature shall be agreed between the parties concerned and recorded in the test report.

9.1 Test portion, initial suspension and dilutions

See ISO 6887-1 and any specific International Standard appropriate to the product concerned.

Use as diluent for preparing the initial suspension either buffered peptone water (B.1), or half-Fraser broth base medium (B.2).

Half-Fraser broth base **without the addition of selective agents** may be used as a diluent for the food or feed sample when both the detection method (see ISO 11290-1) and this enumeration method are carried out on the same test sample. This procedure is to avoid the need to prepare two initial suspensions; the selective agents are added to the suspension once the test portion for enumeration has been used. Use of this procedure should be noted in the test report.

Let the initial suspension stand for 1 h ± 5 min at 20 °C ± 2 °C [by using, if necessary, the incubator 6.3 a)], in order to resuscitate the stressed microorganisms.

If a dilution range is used, prepare it after resuscitation.

9.2 Inoculation and incubation

9.2.1 Transfer, by means of a sterile pipette (6.9), 0,1 ml of the initial suspension (9.1) to each of two dishes of PALCAM agar (B.3), dried beforehand if necessary in the incubator (6.2).

Repeat the procedure using further decimal dilutions if necessary.

NOTE — When, for certain products, it is necessary to estimate low numbers of *Listeria monocytogenes*, the limit of enumeration can be lowered by a factor of 10 by examining 1,0 ml of the initial suspension. Distribute the 1 ml of inoculum either on the surface of the agar medium in a large Petri dish (140 mm) or over the surface of the agar medium in three small dishes (90 mm) using a sterile spreader (6.6). In both cases, prepare duplicates by using two large dishes or six small dishes.

9.2.2 Carefully spread the inoculum as quickly as possible over the surface of the agar plate without touching the sides of the dish with the spreader. Use a fresh sterile spreader for each plate.²⁾ Leave the plates closed for about 15 min at ambient temperature for the inoculum to be absorbed into the agar.

9.2.3 Invert the dishes prepared in 9.2.2 and place them in an incubator [6.3 c)] set at 35 °C or 37 °C. Incubate PALCAM agar dishes either microaerobically in a jar (6.11) containing the gas mixture (6.12) or aerobically.

9.3 Enumeration of characteristic colonies

9.3.1 After incubation for 24 h, and for an additional 18 h to 24 h if growth is slight or if no colonies are observed after 24 h of incubation, examine the dishes (9.2.3) for the presence of colonies presumed to be *Listeria* spp. (see 9.3.3).

2) It is possible to use the same spreader for a given sample, by beginning with the higher dilution.

9.3.2 For dishes incubated microaerobically, after incubation leave the PALCAM agar dishes (9.3.1) to air for 1 h to allow the agar to regain its pink to purple colour.

9.3.3 After 24 h the characteristic colonies of *Listeria* spp. grow as small or very small greyish green or olive green colonies, sometimes with black centres, but always with black halos. After 48 h *Listeria* spp. appear in the form of green colonies, about 1,5 mm to 2 mm in diameter, with a central depression and surrounded by a black halo.

9.3.4 Count all the colonies presumed to be *Listeria* spp. (9.3.3) on each dish containing less than 150 characteristic or non-characteristic colonies.

9.4 Confirmation of *Listeria* spp.

9.4.1 Selection of colonies for confirmation

9.4.1.1 After the period of incubation (9.3.1), keep the dishes containing less than 150 presumptive *Listeria* spp. colonies, at all dilutions and, if possible, at two successive dilutions.

Select five of the presumptive colonies on each plate retained. If there are fewer than five presumptive colonies on a dish, select for confirmation all presumptive colonies.

9.4.1.2 Streak the selected colonies onto the surface of predried plates of tryptone soya yeast extract agar (TSYEA) (B.4) in a manner which will allow well-separated colonies to develop.

Place the plates in the incubator [6.3 c)] set at 35 °C or 37 °C for 18 h to 24 h or until growth is satisfactory.

Typical colonies are 1 mm to 2 mm in diameter, convex, colourless and opaque with an entire edge. If the colonies are not well separated, pick a typical *Listeria* spp. colony onto another TSYEA plate. Carry out the following tests from colonies of a pure culture on the TSYEA.

NOTE — The Henry illumination test may be conducted if necessary (see annex C and note in B.4.2). The colonies then appear bluish with a granular surface.

9.4.2 Catalase reaction

Take a colony separated in 9.4.1.2 and suspend it in a drop of hydrogen peroxide solution (B.10) on a slide. The immediate formation of gas bubbles indicates a positive reaction (see ISO 7218).

9.4.3 Gram staining

Perform the Gram stain on a colony separated in 9.4.1.2 (see ISO 7218). *Listeria* spp. are revealed as Gram-positive slim, short rods (of approximately 0,4 µm to 0,5 µm diameter, and 1 µm to 2 µm length).

9.4.4 Motility test (if necessary)³⁾

Take a colony separated in 9.4.1.2 and suspend it in a tube containing TSYEB (B.5).

Incubate in the incubator [6.3 b)] set at 25 °C for 8 h to 24 h until a cloudy medium is observed.

Deposit a drop of the above culture using a loop (6.5) onto a clean glass microscope slide. Place a coverslip on top and examine it with the microscope (6.14). *Listeria* spp. appear as slim, short rods with tumbling motility.

Cultures grown above 25 °C may fail to exhibit this motion. Always compare them to a known culture. Cocci, large rods, or rods with rapid swimming motility are not *Listeria* spp.

3) This examination is not necessary in all cases if the analysis is carried out by a microbiologist who regularly works on the detection of *L. monocytogenes*.

For an alternative test for motility, using an inoculating needle (6.5), stab the motility agar (B.8) with a typical colony from TSYEA (9.4.1.2). Incubate it for 48 h in the incubator (6.5) at 37 °C.

Examine for growth around the stab. *Listeria* spp. are motile, giving a typical umbrella-like growth pattern immediately below the surface of the agar. If growth is not sufficient, incubate for up to an additional 5 days and examine the culture during this time.

9.5 Confirmation of *L. monocytogenes*

9.5.1 Haemolysis test

9.5.1.1 If the morphological and physiological characteristics and catalase reaction are indicative of *Listeria* spp., determine the haemolytic reaction on sheep blood agar dishes (B.6).

Before use, thoroughly dry the blood agar surface, then mark the agar into squares. For each culture, take a colony separated in 9.4.1.2 and stab one labelled square using a wire (6.5). Also stab positive (*L. monocytogenes*) and negative (*L. innocua*) control cultures.

After incubation at 35 °C or 37 °C for 24 h ± 2 h, examine the test strains and controls. *L. monocytogenes* show narrow, clear, light zones of β-haemolysis⁴⁾; *L. innocua* show no clear zone around the stab. *L. seeligeri* show a weak zone of β-haemolysis. *L. ivanovii* usually show wide, clearly delineated zones of β-haemolysis. Examine the plates by transparency to compare test cultures with controls.

9.5.1.2 The haemolytic reaction may also be carried out by using the CAMP test (9.5.3), or by using red cells in suspension as follows. Disperse the colony in 150 µl of TSYEB (B.5); incubate at 35 °C or 37 °C for 2 h. Add 150 µl of sheep blood red cell suspension (B.12). Incubate at 35 °C or 37 °C for between 15 min and 60 min, then refrigerate at +3 °C ± 2 °C for about 2 h. Examine for the presence or absence of β-haemolysis. If the reaction is not definite, leave the culture at +3 °C ± 2 °C for up to 24 h.

9.5.2 Carbohydrate utilization

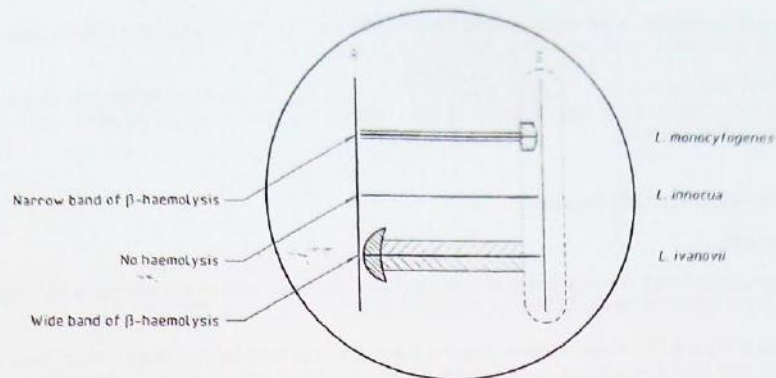
Using a loop (6.5), inoculate each of the carbohydrate utilization broths (B.7) with the culture from TSYEB (9.4.4). Incubate at 35 °C or 37 °C for up to 5 days. Positive reactions [formation of acid(s)] are indicated by the evolution of the colour from purple to yellow and occur mostly within 24 h to 48 h.

9.5.3 CAMP test

Streak each of the *Staphylococcus aureus* and *Rhodococcus equi* (B.9.4) cultures in single lines across the sheep blood agar plate (B.6 or B.9.3) so that the two cultures are parallel and diametrically opposite (see figure 1). A thin, even inoculum is required. This can be obtained by using an inoculation loop or a wire (6.5) held at right angles to the agar.

Streak the test strain separated in 9.4.1.2 in a similar fashion at right angles to these cultures so that the test culture and *S. aureus* and *R. equi* cultures do not touch but at their closest are about 1 mm to 2 mm apart. Several test strains may be streaked on the same plate.

4) The zone of β-haemolysis is more readily seen by removing any colony grown on the surface of agar around the inoculum mark.



NOTES

- 1 Inoculate thin blood agar plates (B.6 or B.9.3) as shown in the diagram. Vertical lines represent streaks of *S. aureus* (S) and *R. equi* (R). Horizontal lines represent streaks of the test cultures. Hatched areas indicate the locations of enhanced haemolysis.
- 2 The dotted area indicates the zone of influence of the *S. aureus* culture.

Figure 1 — Inoculation and interpretation of CAMP test plates

Simultaneously, streak control cultures of *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *L. ivanovii*. If blood agar (B.6) is used, incubate the plates at 35 °C or 37 °C for 18 h to 24 h. If double-layer plates (B.9.3) are used, incubate at 35 °C or 37 °C for 12 h to 18 h.

An enhanced zone of β -haemolysis at the intersection of the test strain with the cultures of *S. aureus* and *R. equi* is considered to be a positive reaction.

The positive reaction with *R. equi* is seen as a wide (5 mm to 10 mm) "arrow-head" of haemolysis. The reaction is considered as negative if a small zone of weak haemolysis extends only about 1 mm at the intersection of the test strain with the diffusion zone of the *R. equi* culture.

- 4 A positive reaction with *S. aureus* appears as a small zone of enhanced haemolysis extending only about 3 mm to 4 mm from the test strain and within the weakly haemolytic zone due to growth of the *S. aureus* culture. Large zones of β -haemolysis do not occur in the proximity area between *S. aureus* and *L. monocytogenes*.

9.6 Interpretation of morphological and physiological properties and of the biochemical reactions

All *Listeria* spp. are small, Gram-positive rods that demonstrate motility (see 9.4.4). If they are observed by Henry illumination, they appear bluish with a granular surface. They are generally catalase positive.

L. monocytogenes are distinguished from other species by the characteristics listed in table 1.

Table 1 — Reactions for the identification of *Listeria* spp.

Species	Haemolysis	Production of acid		CAMP test	
		Rhamnose	Xylose	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	-	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	-

V: variable reaction
 (+): weak reaction
 +: > 90 % of positive reactions
 -: no reaction

NOTE — There exist rare strains of *L. monocytogenes* which do not show β-haemolysis or a positive reaction to the CAMP test under the conditions described in this part of ISO 11290.

9.7 Definitive confirmation

Strains which are considered to be *L. monocytogenes* (9.6) may be sent to a recognized *Listeria* reference laboratory for serological or, possibly, lysogenic typing, or an alternative reliable molecular typing method. The dispatch shall be accompanied by all possible information concerning the strain(s).

10 Expression of results (see ISO 7218)

10.1 Counting of colonies of *L. monocytogenes*

Calculate for each of the plates the number *a* of colonies of *L. monocytogenes* present, using the following formula:

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

where

- b* is the number of colonies conforming to the identification criteria (9.6);
- A* is the number of colonies plated out for confirmation (9.4.1.1);
- C* is the total number of characteristic colonies enumerated on the dish (9.3.4).

Round off *a* to a whole number.

10.2 Method of calculation

10.2.1 Plates containing less than 150 colonies of *L. monocytogenes*, one of which contains at least 15 *L. monocytogenes*

Calculate the number *N* of *L. monocytogenes* present in 1 ml or 1 g of product, using the following formula:

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

where

Σa is the sum of the colonies of *L. monocytogenes* calculated after confirmation, on all the dishes retained at two consecutive dilutions, one of which at least contains at least 15 identified colonies;

V is the volume of the inoculum applied to each dish in millilitres;

n_1 is the number of dishes retained at the first dilution;

n_2 is the number of dishes retained at the second dilution;

d is the dilution factor corresponding to the first dilution retained.

Round the results obtained to two significant figures (see ISO 7218).

Take as the result the number of *L. monocytogenes* per millilitre (liquid products) or per gram (other products), expressed as a number between 1,0 and 9,9 multiplied by 10 to the appropriate power.

NOTE — See ISO 7218 for an example.

10.2.2 Estimation of small numbers

10.2.2.1 If the two dishes, at the level of the initial suspension, contain less than 15 colonies of *L. monocytogenes*, calculate the number of confirmed colonies on each dish, using the formula given in 10.1. Calculate the arithmetical mean y of the colonies counted on two dishes.

Express the result as follows:

— estimated number of *L. monocytogenes* per gram or per millilitre $N_E = \frac{y}{d \times V}$

where

d is the dilution factor of the initial suspension;

V is the volume of inoculum on each dish.

10.2.2.2 If the two dishes at the level of the initial suspension do not contain any colonies, express the result as follows:

— less than $\frac{1}{d \times V}$ *L. monocytogenes* per gram or per millilitre

where

d is the dilution factor of the initial suspension;

V is the volume of inoculum on each dish.

11 Precision

See ISO 7218.

7.8 Anexo 8 – Folha de Prova de Aceitação

Prova de Aceitação

Produto: Iogurte suplementado com algas marinhas

Avalie as amostras fornecidas e assinale com uma cruz (X) qual a aceitabilidade e intensidade atribuída a cada um dos parâmetros considerados. Na escala de avaliação de aceitabilidade o valor de 1 corresponde a "extremamente desagradável", 5 corresponde a "indiferente" e 9 corresponde a "extremamente agradável". Na escala de avaliação de intensidade o valor de 1 corresponde a "pouco intenso", 5 corresponde a "intensidade intermédia" e 9 corresponde a "extremamente intenso".

Amostra I5	Aceitabilidade									Intensidade								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Odor																		
Cor																		
Doce																		
Ácido																		
Textura																		
Sabor a produtos do mar																		
Flavour residual/Persistência de sabor																		

Amostra I6	Aceitabilidade									Intensidade								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Odor																		
Cor																		
Doce																		
Ácido																		
Textura																		
Sabor a produtos do mar																		
Flavour residual/Persistência de sabor																		

Amostra I7	Aceitabilidade									Intensidade								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Odor																		
Cor																		
Doce																		
Ácido																		
Textura																		
Sabor a produtos do mar																		
Flavour residual/Persistência de sabor																		

No global, qual das amostras prefere: _____

Observações: _____

Nome:
 Idade:

Obrigada pela colaboração!

7.9 Anexo 9 – Folha de Prova de Aceitação

Prova de Aceitação

Produto: Iogurte suplementado com algas marinhas

Avalie as amostras fornecidas e assinale com uma cruz (X) qual a aceitabilidade e intensidade atribuída a cada um dos parâmetros considerados. Na escala de avaliação de aceitabilidade o valor de 1 corresponde a "extremamente desagradável", 5 corresponde a "indiferente" e 9 corresponde a "extremamente agradável". Na escala de avaliação de intensidade o valor de 1 corresponde a "pouco intenso", 5 corresponde a "intensidade intermédia" e 9 corresponde a "extremamente intenso".

Amostra L3A	Aceitabilidade									Intensidade								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Odor																		
Cor																		
Doce																		
Ácido																		
Textura																		
Sabor a produtos do mar																		
Flavour residual/Persistência de sabor																		

Amostra L3FT	Aceitabilidade									Intensidade								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Odor																		
Cor																		
Doce																		
Ácido																		
Textura																		
Sabor a produtos do mar																		
Flavour residual/Persistência de sabor																		

Amostra L3AM	Aceitabilidade									Intensidade								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Odor																		
Cor																		
Doce																		
Ácido																		
Textura																		
Sabor a produtos do mar																		
Flavour residual/Persistência de sabor																		

No global, qual das amostras prefere: _____

Observações: _____

Nome:

Obrigada pela colaboração!

Idade:

7.10 Anexo 10 – Folha de Prova Afetiva



21-01-15

DESENVOLVIMENTO DE UM IOGURTE SUPLEMENTADO COM ALGAS MARINHAS

Indique a sua preferência relativamente às amostras fornecidas, colocando um X na amostra que for mais do seu agrado. Entre cada amostra lave a boca com água que se encontra junto das amostras.

567	891

Indique duas razões (atributos) que influenciaram a sua escolha.


Observações:

NOTA: Após terminar a prova certifique-se que deixa o local de prova limpo. Acenda a luz de presença para sinalizar que terminou a prova.

OBRIGADO PELA COLABORAÇÃO!

Nome: _____ Idade: _____

7.11 Anexo 11 – Folha de Prova Triangular

	Desenvolvimento de um Iogurte Suplementado com Algas Marinhas
	Folha de prova triangular – Iogurte

Nome: _____ Data: _____

À sua frente tem 3 amostras de iogurte codificadas. Duas delas são iguais e uma é diferente. Começando da esquerda, avalie as amostras e assinale o código que corresponde à diferente das restantes. Se não consegue detetar a diferença, escolha a melhor possibilidade mesmo que incerta.

1 - Código da amostra diferente: _____

2 - Qual é a amostra preferida? _____

3 - Indique a razão da sua escolha pela sua preferência:

Após terminar a prova certifique-se que deixa o local de prova limpo.
Acenda a luz de presença para sinalizar que terminou a prova.

Obrigada pela sua colaboração!

7.12 Anexo 12 – Tratamento Estatístico dos Resultados

7.12.1 Parâmetros Físico-Químicos

Fator: Tipo de logurte

Tabela 7.12.1 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.

	Sig.
Proteína(%)	,072
Gordura(%)	,000
Cinzas(%)	,407
Humidade(%)	,669
Hidratos(%)	,949
Calorias(kcal)	,726
DPPH(%)	,400
Cor	-
Lactose(%)	-

Tabela 7.12.2 – Teste Kruskal-wallis para o teor de Gordura.

	Gordura(%)
Asymp. Sig.	,020

Tabela 7.12.3 – Teste de comparações múltiplas, Teste Gomes-Howell (Post Hoc), para o teor de Gordura.

Dependent Variable	(I) Amostras	(J) Amostras	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Gordura(%)	logurte Ct_0	logurte A_0	1,14000	,20914	,019
		logurte Ct_30	-,01500	,20914	1,000
		logurte A_30	1,13000	,20914	,019
	logurte A_0	logurte Ct_0	-1,14000	,20914	,019
		logurte Ct_30	-1,15500	,20914	,018
		logurte A_30	-,01000	,20914	1,000
	logurte Ct_30	logurte Ct_0	,01500	,20914	1,000
		logurte A_0	1,15500	,20914	,018
		logurte A_30	1,14500	,20914	,018
	logurte A_30	logurte Ct_0	-1,13000	,20914	,019
		logurte A_0	,01000	,20914	1,000
		logurte Ct_30	-1,14500	,20914	,018

Tabela 7.12.4 – Teste ANOVA para o teor de Proteína, Cinzas, Humidade, Hidratos, Calorias e DPPH.

		Sig.
Proteína(%)	Between Groups	,001
	Within Groups	
	Total	
Cinzas(%)	Between Groups	,211
	Within Groups	
	Total	
Humidade(%)	Between Groups	,009
	Within Groups	
	Total	
Hidratos(%)	Between Groups	,001
	Within Groups	
	Total	
Calorias(kcal)	Between Groups	,010
	Within Groups	
	Total	
DPPH(%)	Between Groups	,148
	Within Groups	
	Total	

Tabela 7.12.5 – Teste de comparações múltiplas, Teste Gomes-Howell (Post Hoc), para o teor de Proteína, Humidade., Hidratos e Calorias.

Dependent Variable	(I) Amostras	(J) Amostras	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Proteína(%)	logurte Ct_0	logurte A_0	-,35500	,09069	,057
		logurte Ct_30	-,05500	,09069	,925
		logurte A_30	-,40000	,09069	,039
	logurte A_0	logurte Ct_0	,35500	,09069	,057
		logurte Ct_30	,30000	,09069	,094
		logurte A_30	-,04500	,09069	,956
	logurte Ct_30	logurte Ct_0	,05500	,09069	,925
		logurte A_0	-,30000	,09069	,094
		logurte A_30	-,34500	,09069	,062
	logurte A_30	logurte Ct_0	,40000	,09069	,039
		logurte A_0	,04500	,09069	,956
		logurte Ct_30	,34500	,09069	,062
Humidade(%)	logurte Ct_0	logurte A_0	,67500	,08682	,005
		logurte Ct_30	-,45000	,08682	,022
		logurte A_30	,27000	,08682	,113
	logurte A_0	logurte Ct_0	-,67500	,08682	,005
		logurte Ct_30	-1,12500	,08682	,001
		logurte A_30	-,40500	,08682	,032
	logurte Ct_30	logurte Ct_0	,45000	,08682	,022
		logurte A_0	1,12500	,08682	,001
		logurte A_30	,72000	,08682	,004

	logurte A_30	logurte Ct_0 logurte A_0 logurte Ct_30	-,27000 ,405000 -,72000	,08682 ,08682 ,08682	,113 ,032 ,004
Hidratos(%)	logurte Ct_0	logurte A_0 logurte Ct_30 logurte A_30	-1,40500 ,48750 -,93350	,20052 ,20052 ,20052	,008 ,212 ,032
	logurte A_0	logurte Ct_0 logurte Ct_30 logurte A_30	1,40550 1,89300 ,47200	,20052 ,20052 ,20052	,008 ,002 ,229
	logurte Ct_30	logurte Ct_0 logurte A_0 logurte A_30	-,48750 -1,89300 -1,42100	,20052 ,20052 ,20052	,212 ,002 ,007
	logurte A_30	logurte Ct_0 logurte A_0 logurte Ct_30	,93350 -,47200 1,42100	,20052 ,20052 ,20052	,032 ,229 ,007
Calorias(kcal)	logurte Ct_0	logurte A_0 logurte Ct_30 logurte A_30	3,22500 1,59500 4,84500	1,02004 1,02004 1,02004	,108 ,485 ,030
	logurte A_0	logurte Ct_0 logurte Ct_30 logurte A_30	-3,22500 -1,63000 1,62000	1,02004 1,02004 1,02004	,108 ,470 ,474
	logurte Ct_30	logurte Ct_0 logurte A_0 logurte A_30	-1,59500 1,63000 3,25000	1,02004 1,02004 1,02004	,485 ,470 ,105
	logurte A_30	logurte Ct_0 logurte A_0 logurte Ct_30	-4,84500 -1,62000 -3,25000	1,02004 1,02004 1,02004	,030 ,474 ,105

Tabela 7.12.6 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.

	Sig.
Acidez(ml/l)	,309
pH	,001

Tabela 7.12.7 – Teste Kruskal-wallis para o pH.

	pH
Asymp. Sig.	,014

Tabela 7.12.8 – Teste de comparações múltiplas, Teste Gomes-Howell (Post Hoc), para o pH.

Dependent Variable	(I) Amostras	(J) Amostras	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
pH	logurte Ct_0	logurte A_0	,02333	,00981	,238
		logurte Ct_15	-,05333	,00981	,002
		logurte A_15	,03667	,00981	,026
		logurte Ct_30	,02667	,00981	,142
		logurte A_30	,03000	,00981	,082
	logurte A_0	logurte Ct_0	-,02333	,00981	,238
		logurte Ct_15	-,07667	,00981	,000
		logurte A_15	,01333	,00981	,749
		logurte Ct_30	,00333	,00981	,999
		logurte A_30	,00667	,00981	,981
	logurte Ct_15	logurte Ct_0	,05333	,00981	,002
		logurte A_0	,07667	,00981	,000
		logurte A_15	,09000	,00981	,000
		logurte Ct_30	,08000	,00981	,000
		logurte A_30	,08333	,00981	,000
	logurte A_15	logurte Ct_0	-,03667	,00981	,026
		logurte A_0	-,01333	,00981	,749
		logurte Ct_15	-,09000	,00981	,000
		logurte Ct_30	-,01000	,00981	,903
		logurte A_30	-,00667	,00981	,981
	logurte Ct_30	logurte Ct_0	-,02667	,00981	,142
		logurte A_0	-,00333	,00981	,999
		logurte Ct_15	,08000	,00981	,000
		logurte A_15	,01000	,00981	,903
logurte A_30		,00333	,00981	,999	
logurte A_30	logurte Ct_0	-,03000	,00981	,082	
	logurte A_0	-,00667	,00981	,981	
	logurte Ct_15	-,08333	,00981	,000	
	logurte A_15	,00667	,00981	,981	
	logurte Ct_30	-,00333	,00981	,999	

Tabela 7.12.9 – Teste ANOVA para a Acidez.

		Sig.
Acidez(ml/l)	Between Groups	,959
	Within Groups	
	Total	

Fator: Tempo de produção

Tabela 7.12.10 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.

	Sig.
Proteína(%)	,927
Gordura(%)	,984
Cinzas(%)	,450
Humidade(%)	,669
Hidratos(%)	,949
Calorias(kcal)	,984
DPPH(%)	,139
Cor	-
Lactose(%)	-

Tabela 7.12.11 – Teste ANOVA para o teor de Proteína, Gordura, Cinzas, Humidade, Hidratos, Calorias, DPPH, Cor e Lactose.

		Sig.
Proteína(%)	Between Groups	,754
	Within Groups	
	Total	
Gordura(%)	Between Groups	,980
	Within Groups	
	Total	
Cinzas(%)	Between Groups	,017
	Within Groups	
	Total	
Humidade(%)	Between Groups	,190
	Within Groups	
	Total	
Hidratos(%)	Between Groups	,446
	Within Groups	
	Total	
Calorias(kcal)	Between Groups	,309
	Within Groups	
	Total	
DPPH(%)	Between Groups	,791
	Within Groups	
	Total	

Tabela 7.12.12 – Teste de comparações múltiplas, Teste Gomes-Howell (Post Hoc), para as Cinzas.

Dependent Variable	(I) Tempo	(J) Tempo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Cinzas(%)	Ct_0	A_0	-,02500	,01458	,422
		Ct_30	-,04500	,01458	,115
		A_30	-,08500	,01458	,015
	A_0	Ct_0	,02500	,01458	,422
		Ct_30	-,02000	,01458	,573
		A_30	-,06000	,01458	,048

	Ct_30	Ct_0	,04500	,01458	,115
		A_0	,02000	,01458	,573
		A_30	-,04000	,01458	,158
	A_30	Ct_0	,08500	,01458	,015
		A_0	,06000	,01458	,048
		Ct_30	,04000	,01458	,158

Tabela 7.12.13 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.

	Sig.
Acidez(ml/l)	,000
pH	,000

Tabela 7.12.14 – Teste Kruskal-wallis para a Acidez e pH.

	Acidez(ml/l)	pH
Asymp. Sig.	,535	,206

Análise de Componentes Principais (PCA)

Axes		1	2	3	4	Total inertia
Eigenvalues	:	0.003	0.000	0.000	0.000	0.003
Lengths of gradient	:	0.110	0.048	0.048	0.000	
Cumulative percentage variance of species data	:	84.1	91.0	91.4	0.0	
Sum of all eigenvalues						0.003

Figura 7.12 – Teste do DCA para verificação da adequabilidade do teste PCA em relação aos parâmetros físico-químicos (Proteína, Matéria Gorda, Cinzas, Humidade, Hidratos de Carbono. Valor Energético. DPPH. Cor e Lactose).

Axes		1	2	3	4	Total variance
Eigenvalues	:	0.687	0.262	0.051	0.000	1.000
Cumulative percentage variance of species data	:	68.7	94.9	100.0	0.0	
Sum of all eigenvalues						1.000

Figura 7.12.1 – Teste do PCA, sendo possível observar a percentagem que cada eixo explica da variabilidade dos dados, relativamente aos parâmetros físico-químicos (Proteína, Matéria Gorda, Cinzas, Humidade, Hidratos de Carbono, Valor Energético, DPPH, Cor e Lactose).

Axes	1	2	3	4	Total inertia
Eigenvalues	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Lengths of gradient	0.012	0.000	0.000	0.000	
Cumulative percentage variance of species data	100.0	0.0	0.0	0.0	
Sum of all eigenvalues					0.000

Figura 7.12.2 – Teste do DCA para verificação da adequabilidade do teste PCA em relação aos parâmetros físico-químicos (Acidez e pH).

Axes	1	2	3	4	Total variance
Eigenvalues	0.780	0.220	0.000	0.000	1.000
Cumulative percentage variance of species data	78.0	100.0	0.0	0.0	
Sum of all eigenvalues					1.000

Figura 7.12.3 – Teste do PCA, sendo possível observar a percentagem que cada eixo explica da variabilidade dos dados, relativamente aos parâmetros físico-químicos (Acidez e pH).

7.12.2 Parâmetros Microbiológicos

Fator: Tipo de logurte

Tabela 7.12.15 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.

	Sig.
M_aero	,027
M_anaero	,019
Lactobacillus	,278
Streptococcus	,030

Tabela 7.12.16 – Teste Kruskal-wallis para os Microrganismos Totais Aeróbios, Microrganismos Totais Anaeróbios e *Streptococcus*.

	M_aero	M_anaero	Streptococcus
Asymp. Sig.	0,275	0,376	0,376

Tabela 7.12.17 – Teste ANOVA para os *Lactobacillus* sp.

	Sig.
Lactobacillus Between Groups	,757
Within Groups	
Total	

Fator: Tempo de produção

Tabela 7.12.18 – Teste da Homogeneidade de Variâncias.

	Sig.
M_aero	,000
M_anaero	,000
Lactobacillus	,000
Streptococcus	,000

Tabela 7.12.19 – Teste Kruskal-wallis para os Microrganismos Totais Aeróbios, Microrganismos Totais Anaeróbios, *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus*.

	M_aero	M_anaero	Lactobacillus	Streptococcus
Asymp. Sig.	0,867	0,257	0,171	0,867

Análise de Componentes Principais (PCA)

Axes	1	2	3	4	Total inertia
Eigenvalues	: 0.542	0.062	0.031	0.000	0.647
Lengths of gradient	: 1.685	0.814	0.720	0.000	
Cumulative percentage variance of species data	: 83.7	93.3	98.0	0.0	
Sum of all eigenvalues					0.647

Figura 7.12.4 – Teste do DCA para verificação da adequabilidade do teste PCA em relação aos parâmetros microbiológicos (Microrganismos Totais Aeróbios, Microrganismos Totais Anaeróbios, *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus*).

Axes	1	2	3	4	Total variance
Eigenvalues	: 0.695	0.293	0.011	0.001	1.000
Cumulative percentage variance of species data	: 69.5	98.8	99.9	100.0	
Sum of all eigenvalues					1.000

Figura 7.12.5 – Teste do PCA, sendo possível observar a percentagem que cada eixo explica da variabilidade dos dados, relativamente aos parâmetros microbiológicos (Microrganismos Totais Aeróbios, Microrganismos Totais Anaeróbios, *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus*).

7.12.3 Análise Sensorial

logurte: produzido com leite meio gordo com lactose

Tabela 7.12.20 - Resultados obtidos na prova sensorial de aceitação efetuada entre 3 amostras de iogurte produzido com leite meio gordo com lactose, em termos de aceitabilidade e intensidade. A escala varia de 1 a 9 e a mesma encontra-se devidamente descrita no tópico 3.4.

Sujeito	Idade	Amostra	Aceitabilidade							Intensidade							Amostra Preferida
			Odor	Cor	Doce	Ácido	Textura	Sabor a produtos do Mar	Flavour Residual	Odor	Cor	Doce	Ácido	Textura	Sabor a produtos do Mar	Flavour Residual	
1	26	15	7	7	5	4	8	5	5	5	5	5	4	5	1	6	15
		16	3	4	3	3	7	5	3	6	5	3	8	5	1	7	
		17	4	3	6	4	7	5	6	6	6	6	6	5	1	7	
2	24	15	5	7	8	8	8	8	8	6	7	5	5	5	6	6	15
		16	5	7	4	4	4	5	4	5	5	4	8	5	5	7	
		17	6	7	6	5	4	5	6	5	5	8	5	5	5	6	
3	29	15	7	8	6	3	8	7	8	6	8	6	3	8	7	8	15
		16	3	6	5	7	7	6	8	3	6	5	7	7	6	8	
		17	2	6	6	5	5	6	8	2	6	6	5	5	6	8	
4	25	15	4	5	9	9	9	5	7	4	5	9	9	9	1	7	15
		16	8	5	9	9	9	7	7	9	5	6	9	9	1	5	
		17	7	5	8	8	9	9	9	9	5	5	5	5	1	7	
5	31	15	8	7	8	8	9	8	8	7	7	7	6	7	6	6	15
		16	7	8	7	7	8	7	7	8	7	6	6	6	8	8	
		17	4	4	5	6	7	6	6	8	7	4	6	7	8	8	
6	23	15	9	8	9	9	8	9	9	6	6	5	1	5	1	6	16
		16	9	9	8	9	6	9	9	6	4	6	2	2	1	7	
		17	9	8	9	9	6	9	9	6	5	7	1	5	1	8	
7	30	15	7	4	3	1	9	1	1	5	5	1	1	9	1	1	17
		16	7	4	2	2	2	1	1	2	4	2	6	2	1	1	
		17	4	5	5	9	9	2	1	7	5	5	1	5	2	1	
8	23	15	7	6	8	9	9	5	9	6	3	6	6	4	1	7	17
		16	7	4	8	8	9	6	8	6	2	6	3	3	2	5	
		17	5	5	9	9	9	7	8	3	2	8	3	3	4	4	
9	23	15	6	7	8	7	9	8	9	4	8	5	3	5	5	2	17
		16	5	7	7	5	9	4	4	7	7	8	9	5	5	7	
		17	8	7	9	9	9	8	9	5	7	9	3	5	5	2	

Tabela 7.12.21 – Matriz de Correlação, onde é visível os pontos de correlação mais fortes, assim como as relações estatisticamente significativas.

		Odor	Cor	Doce	Ácido	Textura	SaborMar	Flavour
Correlation	Odor	1,000	,474	,413	,281	,128	,388	,309
	Cor	,474	1,000	,393	,288	-,044	,561	,470
	Doce	,413	,393	1,000	,846	,526	,750	,813
	Ácido	,281	,288	,846	1,000	,451	,614	,650
	Textura	,128	-,044	,526	,451	1,000	,236	,278
	SaborMar	,388	,561	,750	,614	,236	1,000	,892
	Flavour	,309	,470	,813	,650	,278	,892	1,000
Sig. (1-tailed)	Odor		,006	,016	,078	,263	,023	,059
	Cor	,006		,021	,072	,413	,001	,007
	Doce	,016	,021		,000	,002	,000	,000
	Ácido	,078	,072	,000		,009	,000	,000
	Textura	,263	,413	,002	,009		,118	,080
	SaborMar	,023	,001	,000	,000	,118		,000
	Flavour	,059	,007	,000	,000	,080	,000	

Tabela 7.12.22 – Teste de KMO e Bartlett, onde KMO de 0,754 considerado médio para utilização da análise fatorial.

Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy.		,754
Bartlett's Test of Sphericity	Approx. Chi-Square	119,610
	df	21
	Sig.	,000

Tabela 7.12.23 – Matriz Anti-imagem, onde o tamanho da amostra é considerado adequado pois todos os valores da diagonal estão acima de 0,5.

		Odor	Cor	Doce	Ácido	Textura	SaborMar	Flavour
Anti-image Covariance	Odor	,666	-,199	-,085	,063	,029	-,045	,071
	Cor	-,199	,569	-,010	,013	,127	-,089	,008
	Doce	-,085	-,010	,120	-,120	-,117	,004	-,063
	Ácido	,063	,013	-,120	,271	,019	-,020	,031
	Textura	,029	,127	-,117	,019	,612	-,002	,051
	SaborMar	-,045	-,089	,004	-,020	-,002	,173	-,110
	Flavour	,071	,008	-,063	,031	,051	-,110	,142
Anti-image Correlation	Odor	,718^a	-,323	-,301	,149	,045	-,132	,230
	Cor	-,323	,810^a	-,037	,034	,216	-,284	,028
	Doce	-,301	-,037	,726^a	-,667	-,432	,028	-,482
	Ácido	,149	,034	-,667	,789^a	,046	-,090	,156
	Textura	,045	,216	-,432	,046	,702^a	-,005	,173
	SaborMar	-,132	-,284	,028	-,090	-,005	,790^a	-,703
	Flavour	,230	,028	-,482	,156	,173	-,703	,731^a

a. Measures of Sampling Adequacy(MSA)

Tabela 7.12.24 – Tabela de Comunalidades.

	Initial	Extraction
Odor	1,000	,467
Cor	1,000	,761
Doce	1,000	,919
Ácido	1,000	,767
Textura	1,000	,702
SaborMar	1,000	,816
Flavour	1,000	,798

Tabela 7.12.25 – Tabela da Variância Total Explicada.

Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings			Rotation Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	3,975	56,779	56,779	3,975	56,779	56,779	2,783	39,753	39,753
2	1,255	17,933	74,712	1,255	17,933	74,712	2,447	34,958	74,712
3	,780	11,148	85,859						
4	,432	6,178	92,037						
5	,364	5,203	97,240						
6	,123	1,750	98,991						
7	,071	1,009	100,000						

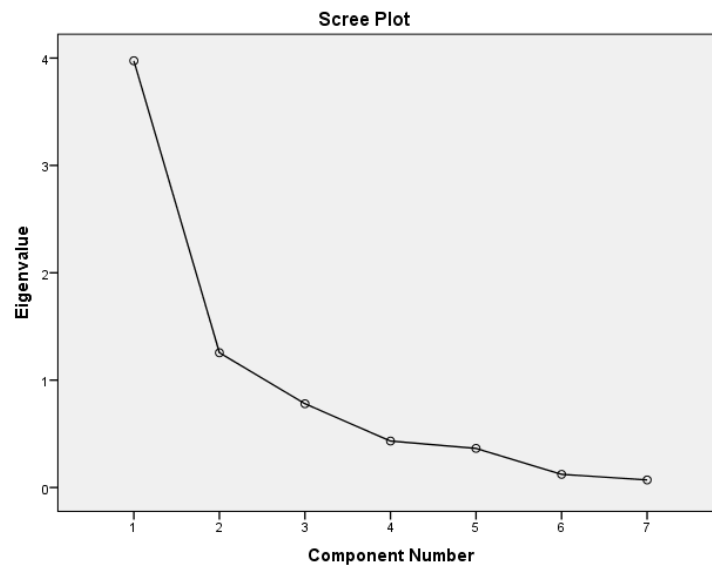


Figura 7.12.6 – Scree Plot.

Tabela 7.12.26 – Matriz dos Componentes após rotação.

	Component	
	1	2
Odor	,111	,674
Cor	,016	,872
Doce	,843	,457
Ácido	,817	,316
Textura	,808	-,222
SaborMar	,563	,706
Flavour	,650	,612

Tabela 7.12.27 – Tabela com valores da análise *Reliability*.

Cronbach's Alpha	Cronbach's Alpha Based on Standardized Items	N of Items
,865	,858	7

Tabela 7.12.28 – Teste de Independência do Qui-Quadrado, quando o fator analisado foi a amostra de iogurte.

		Asymp. Sig.
Pearson Chi-Square	Odor	,423
	Cor	,482
	Doce	,352
	Ácido	,515
	Textura	,361
	SaborMar	,923
	Flavour	,223

Iogurte: produzido com leite meio gordo sem lactose

Tabela 7.12.29 - Resultados obtidos na prova sensorial de aceitação efetuada entre 3 amostras de iogurte produzido com leite meio gordo sem lactose, em termos de aceitabilidade e intensidade. A escala varia de 1 a 9 e a mesma encontra-se devidamente descrita no tópico 3.4.

Sujeito	Idade	Amostr a	Aceitabilidade							Intensidade						Amostra Preferid a
			Odo r	Co r	Doc e	Ácid o	Textur a	Sabor a produtos do Mar	Flavour Residua l	Odo r	Co r	Doc e	Ácid o	Sabor a produtos do Mar	Flavour Residua l	
1	26	L3A	8	9	4	7	9	3	9	7	6	7	5	3	7	L3A
		L3FT	6	8	6	7	9	6	8	8	7	7	6	5	8	
		L3AM	5	8	4	4	5	4	6	5	7	3	8	8	9	
2	27	L3A	8	8	8	8	8	7	8	6	5	6	6	5	6	L3A
		L3FT	6	8	7	7	8	7	7	4	5	5	6	5	6	
		L3AM	8	8	8	7	8	7	8	6	6	6	6	5	6	
3	31	L3A	8	6	7	8	8	2	6	6	4	2	5	1	5	L3A
		L3FT	5	6	7	5	8	5	4	7	2	3	3	3	6	
		L3AM	5	5	5	4	7	6	2	7	3	4	3	5	6	
4	27	L3A	7	6	7	7	8	8	7	3	5	5	3	4	3	L3A
		L3FT	7	6	6	6	8	8	7	4	5	5	6	4	3	
		L3AM	6	4	4	7	8	7	7	3	4	3	3	3	3	
5	22	L3A	9	7	4	6	9	5	7	5	6	3	5	3	3	L3A
		L3FT	6	7	6	5	5	3	4	8	6	3	6	3	3	
		L3AM	8	7	4	4	9	2	2	6	6	3	4	3	3	
6	24	L3A	7	6	7	7	3	8	6	5	5	4	7	7	5	L3AM
		L3FT	3	5	6	6	7	7	7	7	5	6	5	6	5	
		L3AM	8	8	8	8	7	8	8	6	5	7	5	6	7	
7	23	L3A	9	6	9	9	5	9	9	6	6	6	5	5	4	L3FT
		L3FT	9	7	9	9	7	9	9	6	6	6	5	5	7	
		L3AM	9	9	5	9	9	9	9	6	6	3	5	5	5	

Tabela 7.12.30 – Matriz de Correlação, onde é visível os pontos de correlação mais fortes, assim como as relações estatisticamente significativas.

		Odor	Doce	Ácido	Textura	SaborMar	Flavour
Correlation	Odor	1,000	,255	,612	,206	,161	,448
	Doce	,255	1,000	,596	-,293	,528	,365
	Ácido	,612	,596	1,000	,071	,585	,831
	Textura	,206	-,293	,071	1,000	-,169	,126
	SaborMar	,161	,528	,585	-,169	1,000	,557
	Flavour	,448	,365	,831	,126	,557	1,000
Sig. (1-tailed)	Odor		,132	,002	,186	,243	,021
	Doce	,132		,002	,099	,007	,052
	Ácido	,002	,002		,380	,003	,000
	Textura	,186	,099	,380		,231	,292
	SaborMar	,243	,007	,003	,231		,004
	Flavour	,021	,052	,000	,292	,004	

Tabela 7.12.31 – Teste de KMO e Bartlett, onde KMO de 0,663 considerado medíocre para utilização da análise fatorial.

Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy.		,663
Bartlett's Test of Sphericity	Approx. Chi-Square	53,223
	df	15
	Sig.	,000

Tabela 7.12.32 – Matriz Anti-imagem, onde o tamanho da amostra é considerado adequado pois todos os valores da diagonal estão acima de 0,5.

		Odor	Doce	Ácido	Textura	SaborMar	Flavour
Anti-image Covariance	Odor	,543	,046	-,145	-,076	,115	,053
	Doce	,046	,459	-,135	,195	-,112	,111
	Ácido	-,145	-,135	,151	-,038	-,047	-,142
	Textura	-,076	,195	-,038	,786	,092	-,028
	SaborMar	,115	-,112	-,047	,092	,525	-,082
	Flavour	,053	,111	-,142	-,028	-,082	,259
Anti-image Correlation	Odor	,671^a	,091	-,508	-,117	,216	,142
	Doce	,091	,632^a	-,513	,325	-,229	,323
	Ácido	-,508	-,513	,621^a	-,110	-,169	-,717
	Textura	-,117	,325	-,110	,534^a	,143	-,062
	SaborMar	,216	-,229	-,169	,143	,833^a	-,223
	Flavour	,142	,323	-,717	-,062	-,223	,661^a

a. Measures of Sampling Adequacy(MSA)

Tabela 7.12.33 – Tabela de Comunalidades.

	Initial	Extraction
Odor	1,000	,607
Doce	1,000	,696
Ácido	1,000	,916
Textura	1,000	,765
SaborMar	1,000	,660
Flavour	1,000	,761

Tabela 7.12.34 – Tabela da Variância Total Explicada.

Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings			Rotation Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	3,035	50,582	50,582	3,035	50,582	50,582	2,750	45,839	45,839
2	1,369	22,815	73,397	1,369	22,815	73,397	1,653	27,558	73,397
3	,692	11,532	84,929						
4	,466	7,763	92,692						
5	,339	5,656	98,348						
6	,099	1,652	100,000						

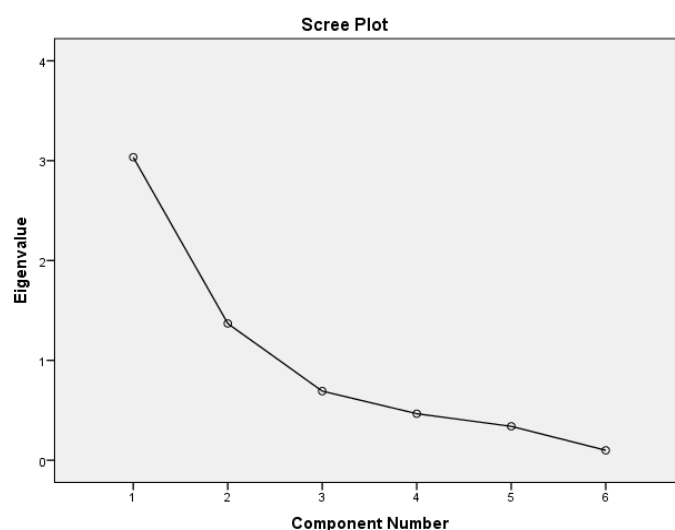


Figura 7.12.7 – Scree Plot.

Tabela 7.12.35 – Matriz dos Componentes após rotação.

	Component	
	1	2
Odor	,758	-,178
Doce	,450	,702
Ácido	,916	,276
Textura	,349	-,802
SaborMar	,530	,616
Flavour	,855	,171

Tabela 7.12.36 – Tabela com valores da análise *Reliability*.

Cronbach's Alpha	Cronbach's Alpha Based on Standardized Items	N of Items
,746	,743	6

Tabela 7.12.37 – Teste de Independência do Qui-Quadrado, quando o fator analisado foi a amostra de iogurte.

		Sig.
Pearson Chi-Square	Odor	,346
	Cor	,504
	Doce	,049
	Ácido	,028
	Textura	,714
	SaborMar	,819
	Flavour	,291

Prova Afetiva

Tabela 7.12.38 – Resultados obtidos na prova afetiva entre o iogurte com lactose (567) e o iogurte sem lactose (891).

Sujeito	Sexo	Idade	Amostra Preferida
1	M	36	567
2	F	23	567
3	M	45	567
4	M	44	567
5	F	27	567
6	F	30	567
7	F	25	567
8	F	35	567
9	F	22	567
10	F	24	567
11	F	24	567
12	M	20	567
13	F	19	567
14	F	18	567
15	F	19	567
16	F	18	567
17	F	20	567
18	M	24	891
19	M	30	891
20	M	23	891
21	M	23	891
22	M	27	891
23	F	42	891

24	F	44	891
25	F	25	891
26	M	27	891
27	F	31	891
28	F	27	891
29	M	31	891
30	F	29	891
31	F	46	891
32	M	62	891
33	F	45	891
34	F	37	891
35	F	22	891
36	F	39	891
37	F	23	891
38	F	23	891
39	F	21	891
40	F	24	891
41	M	19	891
42	F	22	891
43	M	18	891
44	F	19	891
45	F	19	891
46	F	19	891
47	F	20	891
48	F	20	891
49	M	20	891
50	F	21	891

Fator: Idade do provador

Tabela 7.12.39 – Tabela da Homogeneidade de Variâncias.

	Sig.
Amostra Pref.	,021

Tabela 7.12.40 – Teste Kruskal-wallis para a Amostra Preferida.

	Amostra Pref.
Asymp. Sig.	0,907

Fator: Género do provador

Tabela 7.12.41 – Tabela da Homogeneidade de Variâncias.

	Sig.
Amostra Pref.	,124

Tabela 7.12.42 – Teste ANOVA para a Amostra Preferida.

		Sig.
Amostra Pref.	Between Groups	,484
	Within Groups	
	Total	

Prova Triangular

Tabela 7.12.43 – Resultados obtidos na prova triangular entre o iogurte com 0 dias (456,789) e o iogurte com 30 dias (123).

Sujeito	Sexo	Amostra Diferente	Amostra Preferida
1	F	789	456
2	M	789	123
3	M	456	456
4	F	456	456
5	F	789	123
6	F	789	123
7	F	789	456
8	F	789	789
9	F	456	123
10	F	123	456
11	M	789	456
12	F	123	789
13	F	123	789
14	M	789	123
15	M	123	789
16	M	456	123

Fator: Género do provador

Tabela 7.12.44 – Tabela da Homogeneidade de Variâncias.

	Sig.
Amostra Pref.	,603
Amostra Dif.	,949

Tabela 7.12.45 – Teste ANOVA para a Amostra Preferida e Amostra Diferente.

		Sig.
Amostra Pref.	Between Groups	,582
	Within Groups	
	Total	
Amostra Dif.	Between Groups	,499
	Within Groups	
	Total	