



**Márcia Alexandra
Batista Santos**

**Sobrevivência de bactérias lácticas presentes em
iogurtes e outros alimentos fermentados após o
processo de digestão humana**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Márcia Alexandra
Batista Santos**

**Sobrevivência de bactérias lácticas presentes em
iogurtes e outros alimentos fermentados após o
processo de digestão humana**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e do Doutor Ricardo Manuel Abreu de Assunção, Cientista Convidado no Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

o júri

presidente

Prof.^a Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida
Professora auxiliar com agregação da Universidade de Aveiro

Cristina Maria da Fonseca Henriques Oliveira Belo Correia
Técnica superior do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Prof. Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
Professor auxiliar com agregação da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao conselho diretivo e ao Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, por me receberem e por me terem acolhido tão bem. Ao Dr. Ricardo Assunção que foi uma das pessoas essenciais nesta etapa do meu percurso académico, mesmo estando longe esteve presente. À Dra. Rosália Furtado, outra pessoa indispensável, por toda a paciência que teve comigo, ajuda e encorajamento. À Eng. Cristina Belo Correia, pela sua amabilidade e por ter sempre uma palavra de incentivo. A todas as funcionárias do Departamento de Alimentação e Nutrição, que estiveram sempre disponíveis para me auxiliar e um obrigado especial à Dra. Maria João Barreira pela atenção e prontidão demonstrada em qualquer situação. À Dra. Carla Martins pela disponibilidade em ajudar numa das etapas do meu trabalho. Ao professor Artur Alves por ter colaborado como meu orientador interno.

Quero agradecer à minha família, e em particular aos meus pais, por sempre me incentivarem a não desistir; mesmo nos meus dias menos bons demonstraram-se pacientes e compreensivos.

Quero agradecer aos meus amigos, mas de forma muito especial, à Joana Franco, à Patrícia Ricardo, à Daniela Aleixo e à Inês Carvalho que sempre me incentivaram e motivaram.

palavras-chave

Probióticos, bactérias do ácido-láctico, alimentos funcionais, digestão *in vitro*, promoção da saúde.

resumo

A consciencialização da população para o impacto da alimentação na saúde é cada vez mais evidente. Dos alimentos funcionais com características probióticas, o iogurte assume particular destaque no que se relaciona com a aquisição de microrganismos com potencial probiótico. Os probióticos são microrganismos vivos que quando consumidos em quantidade suficiente providenciam benefícios para a saúde do consumidor.

O presente estudo pretendeu avaliar a presença e a capacidade de sobrevivência de bactérias do ácido-láctico, que são potenciais probióticos, em iogurtes e outros alimentos fermentados (kefir e alternativas vegetais ao iogurte). Para isso, procedeu-se à quantificação das bactérias do ácido-láctico presentes naqueles alimentos, e posteriormente, à avaliação da sobrevivência destas bactérias após a ingestão pelos consumidores através da simulação do processo de digestão humana *in vitro* (conforme o método harmonizado desenvolvido no âmbito da Cost Action INFOGEST).

Os resultados obtidos demonstraram que as bactérias do ácido-láctico se encontram em níveis acima dos teores mínimos recomendados ($\geq 10^6$ ufc/g) e ainda que é expectável que a digestão humana afete os níveis destas bactérias que chegam ao intestino. Verificou-se ainda que os diferentes constituintes da formulação do alimento interferem na sobrevivência destas bactérias aquando da sua passagem pelo trato gastrointestinal.

Considerando que a relação entre o consumo de alimentos que sejam veículo de bactérias probióticas e os efeitos na saúde tem ganho cada vez mais interesse, o presente estudo contribui para uma melhor caracterização de alguns dos alimentos fermentados disponíveis em Portugal, bem como com elementos importantes para o desenvolvimento futuro de novos produtos que garantam que o potencial probiótico seja maximizado, nomeadamente através do desenvolvimento de soluções que aumentem a capacidade de resistência ao processo de digestão humana.

keywords

Probiotics, lactic acid bacteria, functional foods, *in vitro* digestion, health promotion

abstract

The awareness of the population about the importance of diet on health is increasingly evident. From the functional foods with probiotic characteristics, yogurt assumes particular importance regarding the acquisition of microorganisms with probiotic potential. Probiotics are living microorganisms that when consumed in sufficient amount provide health benefits to the consumers.

The present study aimed to evaluate the presence and the survival capacity of lactic acid bacteria, which are potential probiotics, in yoghurts and other fermented foods (kefir and vegetable alternatives to yoghurt). Quantification of lactic acid bacteria present in the considered food products, and the survival evaluation of those bacteria after ingestion by the consumers through *in vitro* simulation of human digestion were performed (according to the harmonized method developed under the Cost Action INFOGEST).

The obtained results showed that lactic acid bacteria were present in the considered fermented foods above the recommended minimum levels ($\geq 10^6$ cfu/g). It was also confirmed that it is expected that human digestion could affect the levels of bacteria that reach the intestine. The potential that different components of these food products could interfere with the bacteria survival was also shown.

Regarding the rising interest about the consumption of foods with probiotic potential and the consequent effects on health, the present study contributes to characterize in a better way some of the fermented foods available in Portugal. Important aspects for future development of new food products ensuring that the probiotic potential could be maximized, namely through the development of solutions that increase the resistance capacity to the human digestion, was emphasized.

Índice	
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	viii
Abreviaturas	viii
1.Introdução.....	1
1.1 Relação entre alimentação e saúde	1
1.2 Ecologia intestinal.....	1
1.3 Alimentos funcionais	3
1.4 Probióticos	4
1.4.1 Benefícios dos probióticos para a saúde	6
1.5 Matriz alimentar, produtos lácteos/não lácteos e a sua relação com a promoção da saúde ..	9
1.5.1 Leite de vaca como matriz alimentar	9
1.5.1.1 O iogurte	9
1.5.1.2 Kefir como matriz alimentar	10
1.5.2 Bebida de soja como matriz alimentar alternativa aos produtos lácteos.....	11
1.6. Digestão humana de alimentos	11
1.6.1 Fases do processo de digestão	12
1.7 Simulação do processo de digestão.....	14
1.7.1 Modelos estáticos e modelos dinâmicos	14
1.7.2 Modelos de digestão <i>in vitro</i>	17
2. Objetivos.....	19
3.Materiais e métodos	19
3.1 Amostragem.....	20
3.1.1 Plano de amostragem	20
3.1.2 Caracterização das amostras	20
3.2 Ensaio microbiológicos em iogurtes e outros alimentos fermentados.....	21
3.2.1 Materiais e equipamentos	21
3.2.2 Preparação das amostras	22
3.2.3 Quantificação de bactérias do ácido-láctico (LAB)	22
3.2.4 Identificação de espécies de bactérias através do sistema VITEK® MS	23
3.3 Avaliação da sobrevivência de bactérias do ácido-láctico (LAB) durante o processo de simulação da digestão <i>in vitro</i>	23
3.3.1 Materiais e equipamentos	23
3.3.2 Simulação do processo da digestão humana <i>in vitro</i>	24
3.3.2.1 Preparação das soluções dos fluidos digestivos simulados (FDS)	24
3.3.2.2 Preparação dos tubos teste	24
3.3.2.3 Protocolo de simulação da digestão <i>in vitro</i>	25
3.3.3 Análise estatística	25
4.Resultados.....	26
4.1 Comparação dos métodos de contagem MRS agar e TEMPO® LAB.....	26
4.2 Caracterização microbiológica dos diferentes alimentos fermentados	27
5.Discussão de resultados	35
6. Conclusão.....	41
7. Perspetivas futuras.....	42
8. Bibliografia.....	43
Anexos.....	51
Anexo 1 – A1. Caracterização das amostras incluídas no plano de amostragem por categoria de produto.....	52
Anexo 2 – A2. Valores das contagens de bactérias LAB obtidas em alimentos fermentados (n=45).....	55

Lista de Figuras

Figura 1. Alterações da microbiota intestinal em função da idade.

Figura 2. Eixo microbiota-intestino-cérebro desregulado e disbiose estão associados a alterações no sistema nervoso central e distúrbios psiquiátricos.

Figura 3. Trato gastrointestinal humano.

Figura 4. Características específicas de cada uma das principais regiões do trato gastrointestinal humano.

Figura 5. Esquema-resumo das etapas consideradas no desenho experimental.

Figura 6. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos nas 45 amostras de alimentos fermentados, utilizando duas metodologias: TEMPO® LAB e MRS agar. Letras diferentes (a e b) representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 7. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos nas 45 amostras de alimentos fermentados, analisado por categoria.

Figura 8. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para as 45 amostras de alimentos fermentados, segundo o seu tipo (sólido, batido e líquido). Letras diferentes (a e b) representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 9. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para as 45 amostras de alimentos fermentados, segundo a sua composição (natural, açucarado e aroma). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (a) ($p > 0,05$).

Figura 10. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para as 45 amostras de alimentos fermentados, segundo o teor de gordura (gordo, meio gordo, magro). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (a) ($p > 0,05$).

Figura 11. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para as 45 amostras de alimentos fermentados, segundo a matriz alimentar (leite de vaca e bebida de soja). Letras (a e b) apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 12. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para as 45 amostras de alimentos fermentados, segundo a marca (marca de fabricante e marca própria). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (a) ($p > 0,05$).

Figura 13. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para as 45 amostras de alimentos fermentados, segundo o uso de suplementação (fermentos lácticos e fermentos lácticos e bifidobactérias). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (a) ($p > 0,05$).

Figura 14. Sobrevivência de bactérias LAB presente em seis produtos fermentados diferentes. Os valores de contagem após simulação da digestão indicaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$).

Figura 15. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para 6 produtos fermentados diferentes, segundo o tipo (sólido e batido). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (a) ($p > 0,05$).

Figura 16. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para 6 produtos fermentados diferentes, segundo o teor de gordura (gordo, meio gordo e magro). Letras (a, b e c) apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Figura 17. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para 6 produtos fermentados diferentes, segundo a matriz alimentar (leite de vaca e bebida de soja). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (a) ($p > 0,05$).

Figura 18. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para 6 produtos fermentados diferentes, segundo a marca (marca de fabricante e marca própria). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (a) ($p > 0,05$).

Figura 19. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para 6 produtos fermentados diferentes, segundo suplementação (fermentos lácticos e fermentos lácticos e bifidobactérias). Letras (a e b) apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Lista de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de microrganismos usados em produtos probióticos.

Tabela 2. Principais metodologias *in vitro* utilizadas para a caracterização de estirpes probióticas.

Tabela 3. Critérios para a escolha de um microrganismo probiótico ideal.

Tabela 4. Efeitos benéficos e aplicações terapêuticas de bactérias probióticas em seres humanos.

Tabela 5. Caracterização do iogurte e de leites fermentados segundo a Portaria nº 742/92 de 24 de Julho.

Tabela 6. Complexidade do modelo dinâmico e aplicação ao leite e digestão de laticínios.

Tabela 7. Comparação entre modelos estáticos e dinâmicos de simulação da digestão humana *in vitro*.

Tabela 8. Condições experimentais definidas no modelo de digestão *in vitro* harmonizado no âmbito da INFOGEST.

Tabela 9. Número de amostras incluídas no plano de amostragem por categoria de produto.

Tabela 10. Caracterização dos alimentos utilizados para avaliação da sobrevivência da flora probiótica durante o processo de digestão humana.

Tabela 11. Composição de cada um dos fluidos digestivos simulados (FDS) utilizados no processo de digestão *in vitro*.

Tabela 12. Espécies bacterianas presentes em seis amostras de alimentos fermentados (A, B, C, D, E e F), identificadas através de VITEK® MS, utilizando a técnica MALDI-TOF MS.

Abreviaturas

Abreviatura	Descrição
DAN	Departamento de Alimentação e Nutrição
DGM	<i>Dynamic Gastric Model</i>
DIDGI	<i>Dynamic Digestion Gastrointestinal</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ESIN	<i>Engineered Stomach and small Intestine</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDS	Fluidos Digestivos Simulados
FGS	Fluido Gástrico Simulado
FIS	Fluido Intestinal Simulado
FSS	Fluido Salivar Simulado
GALT	<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>
GI	Gastrointestinal
g/l	Gramas por litro
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>

HGS	<i>Human Gastric Simulator</i>
HPA	<i>Hypothalamic Pituitary Adrenal</i>
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
QPS	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
LAB	Bactérias do ácido-láctico
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MFGM	<i>Milk Fat Globule Membrane</i>
mM	Milimoles
m/m	Massa/massa
mm	Milímetro
mmol/L	Milimoles por Litro
mol/L	Moles por Litro
MRS	de Man, Rogosa, Sharpe
Kg	Kilograma
SHIME	<i>Symulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem</i>
SIMGI	<i>Simulator Gastro-Intestinal</i>
TIM	<i>Technology Integration Matrix</i>
ufc	Unidades formadoras de colónias
ufc/g	Unidades formadoras de colónias por grama
U/ml	Unidades por mililitro
α -CHCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
μ m	Micrómetro

1.Introdução

1.1 Relação entre alimentação e saúde

Uma alimentação adequada constitui uma das estratégias mais eficazes para a promoção de uma vida saudável, reduzindo assim a exposição da população a potenciais fatores de risco que possam ser veiculados pela dieta (Crichton & Alkerwi, 2014). De uma forma geral, constata-se que atualmente a sociedade está mais interessada na relação entre a alimentação e a saúde. As preferências dos consumidores relativa à escolha ou rejeição dos alimentos que consomem baseia-se principalmente em três razões: i) hedónicas ou sensoriais, ou seja, baseadas no sabor ou textura e na aparência; ii) relacionadas com as consequências, previamente conhecidas, decorrentes da ingestão dos alimentos, podendo estes ser categorizados como 'perigosos' (por exemplo alimentos ricos em gordura ou muito calóricos) ou 'benéficos' (por exemplo vegetais); iii) ideacional, nas situações em que os consumidores conseguem à partida distinguir o que são alimentos de por exemplo objetos e pedras que não são comestíveis. Contudo, alguns alimentos também são considerados "inapropriados" por razões sociopolíticas como por exemplo, a carne de uma espécie ameaçada de extinção. No entanto todas as escolhas resultam do facto de as pessoas comerem o que têm disponível, respeitando as tradições e mediante o orçamento disponível para a aquisição dos alimentos pretendidos (Rozin, 2007).

Uma alimentação nutritiva e variada que contenha hidratos de carbono, proteínas, gorduras, vitaminas, sais minerais e água é essencial para que qualquer individuo cresça de forma saudável (Lucas-González, Viuda-Martos, Pérez-Alvarez, & Fernández-López, 2018). Adicionalmente, outro fator de considerável importância que condiciona o estado de saúde é a colonização do corpo humano por microrganismos, muitos dos quais podem ser benéficos ou essenciais na promoção da saúde, enquanto que outros podem causar doenças infecciosas. O resultado das interações entre o hospedeiro e os diferentes microrganismos determinam o equilíbrio entre um estado de saúde ou de doença, representando uma crescente e importante área de investigação (Ding et al., 2019; Thiele, Heinken, & Fleming, 2013).

1.2 Ecologia intestinal humana

O organismo humano é colonizado por uma imensa variedade de microrganismos, simbióticos e patogénicos, sendo aplicado o termo microbioma humano para descrever todos estes microrganismos e seus respetivos genomas; para referir os diferentes organismos dentro desta comunidade microbiana utiliza-se o termo microbiota (Felice & O'Mahony, 2017). A microbiota consiste em comunidades de microrganismos que vivem em harmonia com o seu hospedeiro, formando um ecossistema complexo (Vaikunthanathan, Safinia, Lombardi, & Lechler, 2016), num ambiente definido, como por exemplo o trato gastrointestinal (Quigley, 2017); assim passa a ser denominado como microbiota intestinal. O intestino humano constitui um complexo ecossistema de microrganismos dos quais as bactérias aí presentes podem representar coletivamente mais de 1 kg, apresentam uma composição geral que varia entre 500 a 1000 espécies diferentes e são cruciais tanto para o surgimento de uma variedade de doenças gastrointestinais crónicas como para a manutenção de uma função intestinal normal

(Carlson, 2019). Quando o equilíbrio da microbiota intestinal é perturbado esta evolui para um estado designado por disbiose (Ding et al., 2019). A maioria dos microrganismos intestinais são bactérias, mas também estão presentes organismos pertencentes aos domínios *Archaea* e *Eukarya*, assim como vírus. Os filos mais comuns são Firmicutes, que inclui espécies de *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, entre outros, e Bacteroidetes que inclui espécies de *Bacteroides*. Existem aproximadamente 10^{14} células microbianas no intestino, sendo esta a fração do corpo humano mais densamente povoada (Zoumpopoulou, Pot, Tsakalidou, & Papadimitriou, 2017).

Após o nascimento e até se tornar um ser adulto, verificam-se mudanças consideráveis na microbiota intestinal devido não só à passagem do tempo, mas também a fatores extrínsecos, como por exemplo stresse, dieta e fármacos (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001). Inicialmente pensava-se que o trato gastrointestinal fetal era estéril, mas evidências recentes mostram que a placenta é colonizada por bactérias, apontando para que a exposição a bactérias ocorra mesmo antes do nascimento (Felice & O'Mahony, 2017; Vaikunthanathan et al., 2016). Contudo, a colonização do intestino ocorre de forma mais significativa após o parto (Figura 1). Dentro de um a dois dias, são detetados nas fezes bactérias coliformes, mais precisamente bactérias da família Enterobacteriaceae (Felice & O'Mahony, 2017), e dos géneros *Enterococcus*, *Clostridium* e *Lactobacillus*; dentro de três a quatro dias surgem bactérias do género *Bifidobacterium* que se tornam predominantes ao quinto dia, conduzindo a uma diminuição de bactérias coliformes. A partir do momento em que deixa de haver amamentação e com o desenvolvimento do ser humano o perfil da microbiota vai-se alterando. O género mais comum de bactérias no trato gastrointestinal passa a ser *Bacteroides*, que representa 86% da microbiota total, seguido por *Eubacterium*; a proporção de bifidobactérias diminui e o género *Bifidobacterium* passa a ser o terceiro género mais comum no trato gastrointestinal. Durante a fase adulta, a microbiota intestinal mantém-se relativamente estável, mas numa idade mais avançada, esta volta a modificar-se novamente. As bifidobactérias diminuem ainda mais enquanto certos tipos de bactérias patogénicas aumentam. Por exemplo, uma diminuição dramática no número de bifidobactérias e um aumento no *Clostridium perfringens*, causa diarreia em pessoas idosas (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001).

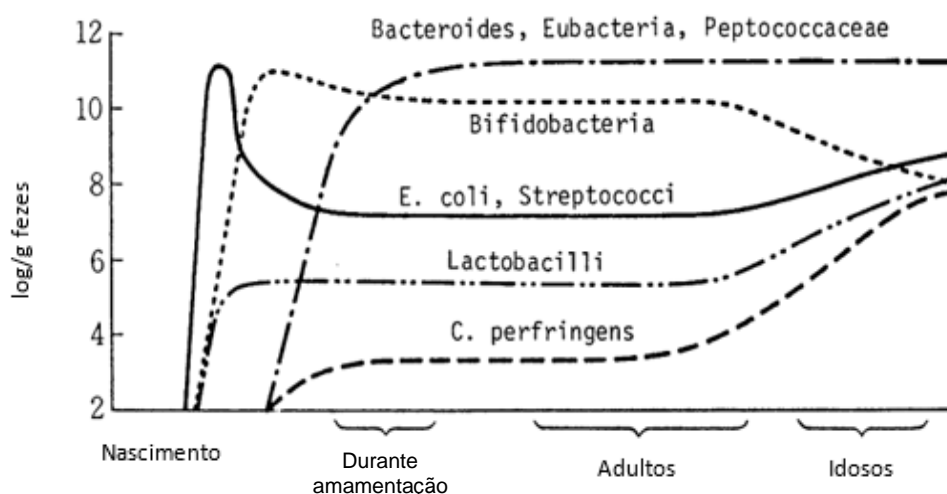


Figura 1. Alterações da microbiota intestinal em função da idade. (Adaptado de (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001; Mitsuoka, 1982)

É importante referir que apesar da reconhecida complexidade da microbiota intestinal esta mantém-se relativamente estável em seres humanos saudáveis. Contudo qualquer perturbação desse equilíbrio poderá culminar com o desenvolvimento de doença, em consequência da predominância de alguns microrganismos indesejáveis (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001).

Por outro lado, em caso de doença, a microbiota pode desempenhar um papel importante na prevenção, progressão e possível tratamento. A modulação microbiana tem sido estudada como uma nova terapêutica no combate a várias doenças e pode ser realizada através da administração direta de estirpes específicas para o controle de determinada doença ou através de intervenções dietéticas, uma vez que é reconhecido o papel da dieta na composição da microbiota intestinal (N. Zhang, Ju, & Zuo, 2018). Novas pesquisas têm sido realizadas no sentido de adaptar os planos terapêuticos de algumas doenças em função do microbioma individual, bem como clarificar variações interindividuais, relacionando o microbioma, a dieta e o genótipo (Ding et al., 2019). Desta forma, reconhece-se atualmente que a dieta, alguns alimentos (por exemplo alimentos ricos em fibra e fontes de proteína de origem vegetal) e a baixa ingestão de gordura assumem um papel crucial no estabelecimento do microbioma humano, e em consequência na sua modulação e desenvolvimento de doenças (Danneskiold-Samsøe et al., 2019; N. Zhang et al., 2018).

1.3 Alimentos funcionais

A consciencialização da população para as propriedades benéficas de certos alimentos consumidos levou a indústria a investir e desenvolver produtos inovadores, tais como os designados “alimentos funcionais”. Estes alimentos, para além dos inerentes efeitos nutricionais, podem apresentar na sua constituição ingredientes (como por exemplo, antioxidantes e fibras alimentares) ou uma estrutura e propriedades que podem ser modificados funcionalmente após o seu consumo, conferindo benefícios para o consumidor. Por definição, estes efeitos benéficos devem estar associados a doses que possam integrar uma dieta normal. A formulação dos alimentos funcionais deverá refletir e considerar o comportamento espectável durante todo o processo de digestão, desde a sua transformação física inicial até à absorção dos seus nutrientes (Bornhorst, Gouseti, Wickham, & Bakalis, 2016). Ainda, para que um alimento seja considerado funcional, é necessário que pelo seu consumo aumente a biodisponibilidade de alguns nutrientes (i.e a quantidade total de um nutriente que é libertada do alimento e absorvida, para alcançar a corrente sanguínea e assim exercer as suas funções nos órgãos alvo (Lucas-González et al., 2018)) ou incluir componentes considerados benéficos para a saúde do consumidor, surgindo neste contexto os alimentos com culturas probióticas incorporadas (Gobbetti, Cagno, & De Angelis, 2010). Os alimentos probióticos mais populares são os alimentos lácteos fermentados, como o iogurte e o leite, mas outros alimentos têm sido formulados, como é o caso do queijo, produtos à base de cereais como barras de aveia, frutos secos, sumos naturais e alguns vegetais como as azeitonas preservadas em salmoura (Lavermicocca, 2006). No caso dos alimentos funcionais fermentados os benefícios para a saúde podem ser expressos diretamente através das interações do hospedeiro com os microrganismos vivos ingeridos (efeito probiótico) ou indiretamente

como resultado da ingestão de metabolitos microbianos sintetizados durante a fermentação (efeito biogénico) (Gobbetti et al., 2010).

1.4 Probióticos

Os microrganismos probióticos são definidos, segundo a *Food and Agriculture Organisation of the United Nations* (FAO), como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization, 2002), e são encontrados predominantemente em três categorias principais: em alimentos, em suplementos alimentares e em produtos farmacêuticos (Sanders, Merenstein, Merrifield, & Hutkins, 2018). Decorrente da crescente evidência científica e consequente consciencialização dos consumidores, tem-se assistido nos últimos anos a um aumento do número de produtos alimentares e de suplementos dietéticos disponíveis no mercado (Zoumpopoulou et al., 2017). A utilização destes microrganismos vivos (probióticos) constitui um meio benéfico de contribuir positivamente para a função do ecossistema intestinal a fim de melhorar o estado nutricional e a saúde do indivíduo (Sanders et al., 2018).

Os microrganismos probióticos correspondem principalmente as bactérias ácido-lácticas (LAB), mas as bifidobactérias e as leveduras também têm sido empregues com sucesso como culturas probióticas (Salminen, Kenifel, & Ouwehand, 2011). Os géneros mais comumente utilizados, nas preparações probióticas, são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Lactococcus*. (Galdeano, de Moreno de LeBlanc, Vinderola, Bonet, & Perdígón, 2007). As LAB são bactérias de Gram positivo e em conjunto com as bifidobactérias foram os primeiros microrganismos probióticos identificados. As bifidobactérias são comensais de humanos e animais, ou seja, fazem parte do microbioma humano e animal e apresentam pouco ou nenhum potencial de patogenicidade, pertencem ao filo Actinobacteria, e são por vezes consideradas, em *sensu lato*, LAB devido à sua fisiologia e ecologia. Várias LAB também fazem parte do microbioma humano e por estarem relacionadas com a manutenção da saúde do hospedeiro, em conjunto com as bifidobactérias, são-lhes atribuídas a designação de seguras, em inglês *Generally Recognized As Safe* (GRAS), concedido pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) (Zoumpopoulou et al., 2017). Para além disso, são colocadas na lista de agentes biológicos com *status* de Presunção Qualificada de Segurança (QPS), concedido pela *European Food Safety Authority* (EFSA) (Zoumpopoulou et al., 2017); esta lista é atualizada a cada três anos e tem em consideração, entre outros fatores, o facto de estes agentes biológicos não apresentarem riscos para a saúde (European Food Safety Authority (efsa), n.d.). Os membros do género *Lactobacillus* são mais comumente classificados como seguros ou geralmente reconhecidos como seguros (GRAS), enquanto os membros dos géneros *Streptococcus* e *Enterococcus* contêm muitos agentes patogénicos oportunistas (Salminen et al., 2011). As bactérias probióticas usadas em alimentos para consumo humano são geralmente de origem humana, não patogénicas e são capazes de se manterem viáveis ao longo do trato gastrointestinal; estão apresentados na Tabela 1 alguns destes microrganismos probióticos (Salminen et al., 2011).

Tabela 1. Exemplos de microrganismos usados em produtos probióticos. (Adaptado de (Salminen et al., 2011)).

Lactobacillus	Bifidobacterium	Outras LAB	Não-LAB
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Bif. breve</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp.	<i>Bif. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
<i>bulgaricus</i>	<i>Bif. longum</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	<i>Bif. adolescentis</i>	<i>thermophilus</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Lb. reuteri</i>	<i>Bif. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>		<i>freudenreichii</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Bif. bifidum</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lb. salivarius</i>			
<i>Lb. paracasei</i>			
<i>Lb. fermentum</i>			
<i>Lb. plantarum</i>			
<i>Lb. crispatus</i>			

A fim de se poder afirmar quais as características ideais de um microrganismo probiótico é necessário caracterizar o seu comportamento perante as diferentes condições a que irá estar sujeito, após a ingestão e durante todo o processo de digestão. Segundo as recomendações da FAO, e conforme resumido na Tabela 2, estão disponíveis um conjunto de metodologias *in vitro* para o estudo de estirpes probióticas (Wahyono, Pudjono, & Widyati, 2010).

Tabela 2. Principais metodologias *in vitro* utilizadas para a caracterização de estirpes probióticas. (Adaptado de (Wahyono et al., 2010))

Resistência à acidez gástrica
Resistência aos ácidos biliares
Adesão ao muco e/ou células epiteliais humanas e linhas celulares
Atividade antimicrobiana relativamente a bactérias potencialmente patogénicas
Capacidade de reduzir a adesão de agentes patogénicos a superfícies
Atividade de hidrólise de sais biliares
Resistência a espermicidas (aplicável a probióticos para uso vaginal)

De acordo com Gupta e Garge (2009), um probiótico ideal deve apresentar as propriedades descritas na Tabela 3 (Gupta & Garge, 2009). É também recomendável que o número de bactérias vivas que atinjam o intestino delgado diariamente seja de pelo menos 10^8 - 10^9 para que possam exercer o seu efeito probiótico. Para que tal seja possível é necessária uma ingestão diária total de cerca de 10^9 - 10^{10} bactérias probióticas viáveis (Sanders, M. E. & in't Veld, H., 1999) o que, no caso dos alimentos, estas quantidades devem ser obtidas idealmente através da ingestão de aproximadamente 100 g/dia de alimento (Calabuig-Jiménez et al., 2019).

Tabela 3. Critérios para a escolha de um microrganismo probiótico ideal. (Adaptado (Gupta & Garge, 2009))

Critérios para a escolha de um microrganismo probiótico ideal
Alta viabilidade celular, devendo ser resistentes a pH baixo e a substâncias ácidas
Capacidade de persistir no intestino, mesmo que a estirpe probiótica não possa colonizar o

intestino (pode ser necessária a administração contínua)
Capacidade de adesão ao epitélio intestinal
Capacidade de interagir ou enviar sinais às células imunes associadas ao intestino
Ser de origem humana
Não-patogénico
Resistente às várias etapas de processamento do produto
Ter capacidade para influenciar positivamente a atividade metabólica local

1.4.1 Benefícios dos probióticos para a saúde

O consumo de probióticos é considerado benéfico para a saúde uma vez que previne infeções, melhora o desempenho do sistema imunológico e combate várias doenças, para além das doenças intestinais, salvaguardando a boa saúde do indivíduo. Os probióticos passaram a ser reconhecidos como benéficos para o tratamento de doenças no campo da síndrome metabólica (por exemplo obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, doença hepática gordurosa não alcoólica, etc.), da atividade psicotrópica, através do eixo microbiota-intestino-cérebro, e das atividades anti mutagénicas ou anticancerígenas (Quigley, 2019; Zoumpopoulou et al., 2017).

Os probióticos são derivados da microbiota comensal do intestino humano e como tal irão imitar os efeitos homeostáticos da microbiota saudável. Estes tanto atuam ao nível do melhoramento do sistema imunitário como ao nível do melhoramento do metabolismo. No caso da ação anti-inflamatória, desencadeiam uma cascata de reações através de interações entre a membrana mucosa e o sistema imunológico, mais precisamente ao nível dos recetores Toll-like, que leva à produção aumentada de anticorpos, conduzindo à indução da apoptose por células T e ao aumento da expressão de citocinas (anti-inflamatórias ou pró-inflamatórias), como a interleucina (Quigley, 2019), e à produção de defensinas pelo hospedeiro (Saulnier, Spinler, Gibson, & Versalovic, 2009). Sabe-se que a capacidade de diferentes estirpes probióticas prevenirem ou reverterem várias condições patológicas, através da estimulação do sistema imunológico, indica que são capazes de gerar uma resposta imune; este processo designa-se por imunomodulação (Galdeano et al., 2007; Saulnier et al., 2009).

No caso de infeções entéricas, podem melhorar o sistema de defesa do hospedeiro contra agentes patogénicos através da promoção da produção de mucina e da redução da permeabilidade intestinal, impedindo a penetração de organismos patogénicos e substâncias tóxicas ou ainda através da produção de compostos antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de muitos agentes patogénicos conduzidos por alimentos. Estes auxiliam a função da barreira intestinal (manter a impermeabilidade intestinal), que está relacionado com várias doenças como por exemplo a síndrome do intestino irritável, doença intestinal inflamatória e com o intestino permeável e translocação bacteriana, que conseqüentemente leva a doenças relacionadas com o fígado. Também produzem bacteriocinas, que inibem as bactérias pró-inflamatórias, mas que promovem o crescimento de espécies benéficas como Lactobacilli e Bifidobacteria. Por exemplo, algumas das bactérias lácticas produzem ácidos orgânicos, como o lactato e o acetato, que criam esse ambiente ácido que é inibidor de agentes patogénicos, podendo estes compostos antimicrobianos ser aplicados como agentes profiláticos contra infeções entéricas ou até como conservantes de alimentos (Quigley, 2019; Saulnier et al., 2009).

Mais recentemente têm surgido vários estudos que relacionam a importância do eixo microbiota-intestino-cérebro com os benefícios na função intestinal, afirmando a capacidade da microbiota intestinal modular o desenvolvimento do cérebro e, conseqüentemente, influenciar emoções e comportamentos (Felice & O'Mahony, 2017; Quigley, 2019; Vaikunthanathan et al., 2016). Em condições fisiológicas normais, este eixo é responsável pela modulação dos métodos digestivos (ou seja, motilidade, secreção), função imunológica, percepção e resposta emocional aos estímulos viscerais.

No intestino, as bactérias podem produzir substâncias neuro-ativas que podem ter impacto a nível local, alterando a secreção, a motilidade e o fluxo sanguíneo, mas também o sistema nervoso central (SNC) (Figura 2). A alta comorbidade (associação de várias doenças no mesmo paciente) entre sintomas psiquiátricos associados ao stress, como ansiedade, com perturbações gastrointestinais, incluindo síndrome do intestino irritável e doença inflamatória intestinal, são mais uma evidência do impacto do referido eixo (Felice & O'Mahony, 2017).

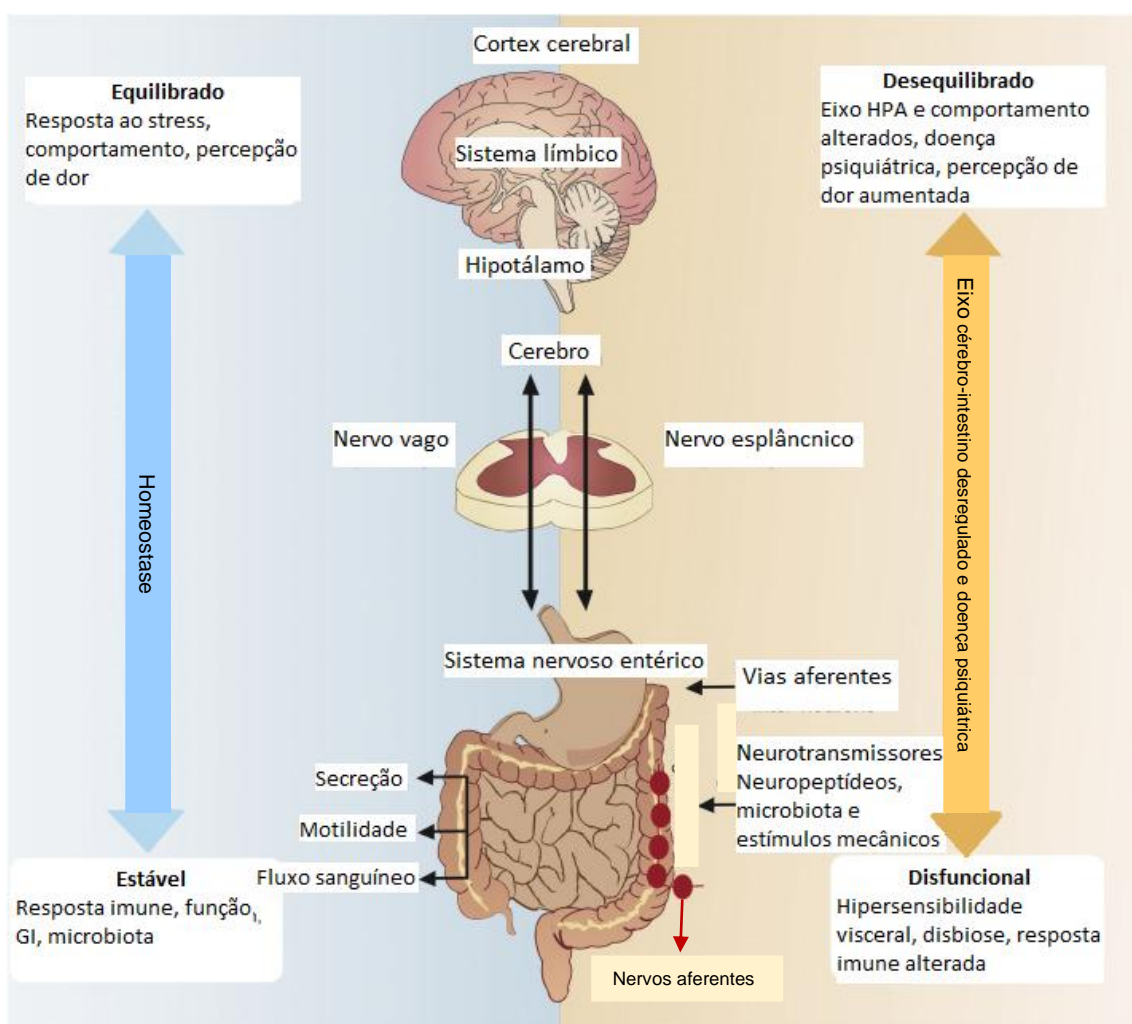


Figura 2. Eixo microbiota-intestino-cérebro desregulado e disbiose estão associados a alterações no sistema nervoso central e distúrbios psiquiátricos. (Adaptado de (Felice & O'Mahony, 2017))

A Tabela 4 elenca alguns dos benefícios e aplicações terapêuticas associadas ao consumo de probióticos. Deve realçar-se que os efeitos benéficos bem como as respetivas aplicações terapêuticas estão dependentes, entre outros fatores, das estirpes probióticas consideradas (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001; Sanders et al., 2018).

Tabela 4. Efeitos benéficos e aplicações terapêuticas de bactérias probióticas em seres humanos. (Adaptado de (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001) e (Sanders et al., 2018))

Efeitos benéficos	Aplicações terapêuticas
Manutenção de microflora intestinal	Prevenção de infeção urogenital
Melhoria do sistema imunológico	Alívio da prisão de ventre
Redução da intolerância à lactose	Proteção da Diarreia do Viajante
Redução dos níveis séricos de colesterol	Prevenção da diarreia infantil e cólicas em bebés amamentados
Atividade anti carcinogénica	Redução da diarreia induzida por antibióticos
Melhoria do valor nutricional dos alimentos	Prevenção da hipercolesterolemia
Redução da incidência e duração de doenças infecciosas comuns (trato respiratório superior e gastrointestinal)	Proteção contra cancro do cólon e da bexiga
	Prevenção da osteoporose
	Prevenção da dermatite atópica (em bebés)
	Prevenção da hipersensibilidade alimentar (em bebés)
	Prevenção de enterocolite necrosante
	Prolongamento do período de remissão da colite ulcerativa
	Melhorar a eficácia terapêutica do tratamento antibiótico da vaginose bacteriana

A significância dos efeitos dos probióticos em humanos é pouco conhecida devido ao facto de que a maioria dos estudos disponíveis atualmente foram realizados em modelos animais, como roedores e suínos (Pirbaglou et al., 2016). Os resultados em humanos mostram-se menos consistentes e difíceis de demonstrar, justificando-se possivelmente pelo facto de que os efeitos dos probióticos podem ser subtis e/ou a sua ação pode ocorrer a níveis que não sejam facilmente detetáveis através de análise às fezes, como por exemplo por ação ao nível do intestino delgado ou estômago e não no cólon (Quigley, 2019). Ainda assim, os probióticos têm sido amplamente estudados para que possam ser incluídos em alimentos que garantam a sua viabilidade, e que permaneçam ativos e em níveis consideráveis no produto final e durante o seu prazo de validade (Kok & Hutkins, 2018). Um desses alimentos são os alimentos fermentados, como por exemplo o iogurte; estes possuem uma grande aceitação pelos consumidores, reúnem uma importante história cultural, e apresentam excelente valor nutritivo, sendo o iogurte um dos produtos lácteos fermentados mais conhecido desde há milhares de anos (Ashraf & Shah, 2011; M. E. Sanders et al., 2018).

1.5 Matriz alimentar, produtos lácteos/não lácteos e a sua relação com a promoção da saúde

A "matriz alimentar" descreve um alimento relativamente à sua estrutura e conteúdo nutricional e em como ambos interagem entre si. A natureza da estrutura física complexa dos alimentos, juntamente com a mistura de nutrientes e de compostos bioativos, pode afetar a digestão, a absorção e o metabolismo dos nutrientes, afetando as propriedades nutricionais dos mesmos e conseqüentemente a saúde dos consumidores. Assim, a matriz alimentar pode contribuir para a alteração das propriedades nutricionais de um alimento (Burgain et al., 2014; Thorning et al., 2017).

1.5.1 Leite de vaca como matriz alimentar

Os produtos lácteos, como queijo, iogurte e leite fermentado são geralmente fontes de bactérias LAB. As matrizes alimentares lácteas permitem a sobrevivência bacteriana, considerando o potencial para o estabelecimento de interações entre estas bactérias e os componentes do leite. O leite de vaca é uma mistura complexa que inclui proteínas, carboidratos, lípidos, minerais e vitaminas. A matriz láctea é habitualmente constituída por: proteínas do soro do leite (as principais, β -lactoglobulina e a α -lactalbumina), lactose (dissacarídeo derivado de glicose e galactose), glóbulos de gordura do leite (pequenos glóbulos esféricos variando de 0,1 a 20 μ m de diâmetro e circundados por uma membrana complexa - a membrana do glóbulo de gordura do leite *Milk Fat Globule Membrane* (MFGM)), minerais (cálcio, fosfato inorgânico e citrato e ainda magnésio, sódio, potássio e cloro), e vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) e hidrossolúveis (C, B1, B2) (Burgain et al., 2014). Os produtos lácteos são os mais adequados para o desenvolvimento de alimentos probióticos (Calabuig-Jiménez et al., 2019), devido à capacidade tamponante da matriz alimentar (Zoumpopoulou et al., 2017).

1.5.1.1 O iogurte

O iogurte é definido, segundo a Portaria nº 742/92 de 24 de Julho (Anónimo, 1992), como sendo "o produto coagulado obtido por fermentação láctica devido à ação exclusiva do *Lactoabacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e do *Streptococcus thermophilus* sobre o leite e produtos lácteos (...), devendo a flora específica estar viva e abundante no produto final." A Portaria nº742/92, define também os iogurtes e os leites fermentados quanto à sua composição, tipo e matéria gorda constituinte (Tabela 5). Durante o processo de fermentação láctica ocorrem alterações bioquímicas tais como: conversão de hidratos de carbono em ácido láctico ou outros metabólitos (glicólise); hidrólise de caseínas em péptidos e aminoácidos livres (proteólise); e degradação da gordura do leite em ácidos gordos livres (lipólise) (Chen et al., 2017).

Tabela 5. Caracterização do iogurte e de leites fermentados segundo a Portaria nº 742/92 de 24 de Julho. (Anónimo, 1992)

Composição	Tipo	Matéria Gorda
Natural: não tem quaisquer ingredientes adicionados além das matérias-primas, culturas microbianas e ingredientes facultativos	Sólido: coagulados nas embalagens individuais de venda a retalho	Gordo: teor mínimo de matéria gorda, na parte láctea de 3,5% (m/m)
Açucarado: iogurte ou leite fermentado natural com sacarose, ou açúcares ou edulcorante	Batido: previamente coagulados e só posteriormente embalados	Meio gordo: teor mínimo de matéria gorda, na parte láctea de 1,5% (m/m) e máximo de 1,8% (m/m)
Aromatizado: iogurte ou leite fermentado ao qual foram adicionados ingredientes aromáticos ou aditivos alimentares	Líquido: liquefeitos depois de coagulados e só posteriormente embalados	Magro: teor máximo de matéria gorda de 0,3%

Vulgarmente o termo “iogurte” é aplicado não só ao iogurte padrão, conforme definido na Portaria nº 742/92, como também a outros produtos decorrentes de variações do iogurte padrão, em que podem ser adicionadas outras culturas; contudo as bactérias *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, são as dominantes (García, Rendueles, & Díaz, 2019). Comercialmente o iogurte é classificado em dois grupos principais: o iogurte de cultura padrão e o iogurte probiótico (Fazilah, Ariff, Khayat, Rios-Solis, & Halim, 2018). O iogurte de cultura padrão, conforme referido anteriormente e em acordo com a Portaria nº 742/92, é tipicamente produzido através da fermentação por estirpes de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, sendo estas consideradas bactérias LAB. O iogurte probiótico, por outro lado, é suplementado com estirpes probióticas como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus acidophilus* (Arena et al., 2015). Contudo tal distinção não exclui *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* da categoria de probiótico, desde que estas culturas *starter* atendam à definição de probiótico (Guarner et al., 2005). Se o produto não contiver os seguintes microrganismos *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* como fundamentais, passa a ser classificado como “leite fermentado” (Anónimo, 1992).

1.5.1.2 Kefir como matriz alimentar

O kefir, quando produzido a partir do leite, é um produto lácteo fermentado em que a hidrólise da lactose, durante a fermentação, ocorre pela ação simultânea de bactérias, nomeadamente bactérias LAB e bactérias ácido acético, leveduras e fungos filamentosos. Estes organismos, através de relações simbióticas complexas, organizam-se nos designados grãos de kefir (Pogačić, Šinko, Zamberlin, & Samaržija, 2013). Porém os grãos de kefir podem ser adicionados a qualquer solução de sacarose (com ou sem extratos de fruta) obtendo-se assim um produto de igual valor nutricional, mas não láctico (Corona et al., 2016). Em consequência da fermentação promovida pelas leveduras, o produto final contém quantidades significativas de CO₂ e uma quantidade variável de álcool. Contudo, o ácido láctico é o principal metabolito destas fermentações. Outros

compostos orgânicos podem também ser formados, como por exemplo, peptídeos bioativos, exopolissacarídeos e bacteriocinas que se presume terem um efeito probiótico na saúde humana (Pogačić et al., 2013). O gênero bacteriano que domina os grãos de kefir é o *Lactobacillus*, embora tenha sido demonstrado a presença de *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e ainda alguns outros gêneros em menor quantidade. Em relação à microbiota de fungos é dominada principalmente por leveduras pertencentes aos seguintes gêneros: *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Issatchenkia* e *Dekkera* (Dertli & Çon, 2017; García et al., 2019).

1.5.2 Bebida de soja como matriz alimentar alternativa aos produtos lácteos

A bebida de soja é obtida através dos grãos de soja, que dão origem a um extrato aquoso contendo altas quantidades de proteína, ferro e niacina, mas baixa concentração de gordura, carboidratos e cálcio em comparação com leite de vaca e com o leite humano. Além disso, é isento de colesterol e lactose. Esta é uma alternativa ao leite para pessoas intolerantes à lactose, alérgicas à proteína do leite e para as que reduzem ou excluem alimentos de origem animal da sua alimentação (Rodríguez-Roque, Rojas-Graü, Elez-Martínez, & Martín-Belloso, 2013). A nível nutricional, a soja apresenta proteínas de alta qualidade, ácidos gordos polinsaturados, oligossacarídeos, oligoelementos, fibras alimentares e vitaminas (Bedani, Rossi, & Isay Saad, 2013; Bedani, Vieira, Rossi, & Saad, 2014).

A soja permite o desenvolvimento de alimentos funcionais probióticos não lácteos, sendo demonstrado em vários estudos que os produtos de soja, particularmente as alternativas ao iogurte, são bons meios de aquisição de probióticos, dado que a proteína e os oligossacarídeos presente na bebida de soja fermentada, estimulam o crescimento de várias bactérias probióticas, tais como: *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Streptococcus thermophilus* (Bedani et al., 2013; Bedani et al., 2014; Mishra Pandey & Mishra, 2015).

1.6. Digestão humana de alimentos

A digestão de alimentos é um processo complexo e que envolve diversos fatores e variáveis que têm contribuído para despertar o interesse da indústria alimentar, em estudos de investigação, devido às relações entre alimentação e saúde ou doença (Bornhorst et al., 2016). Os processos que ocorrem durante a digestão podem ser classificados em dois tipos: a transformação mecânica, com o objetivo de reduzir o tamanho das partículas dos alimentos, e a transformação enzimática, em que diferentes enzimas contribuem para a transformação de macromoléculas em moléculas mais assimiláveis e que podem ser absorvidas para a corrente sanguínea (Lucas-González et al., 2018).

A digestão dos alimentos ingeridos ocorre ao longo do trato gastrointestinal (Figura 3), sendo este constituído pelo tubo digestivo (em que os principais órgãos são o esófago, o estômago, o intestino delgado e o intestino grosso), por órgãos acessórios, incluindo os dentes, a língua e as glândulas salivares associadas à cavidade oral, fígado e pâncreas, cujas secreções (enzimas hidrolíticas e sais biliares) são libertadas no duodeno (Amerongen, 2018).

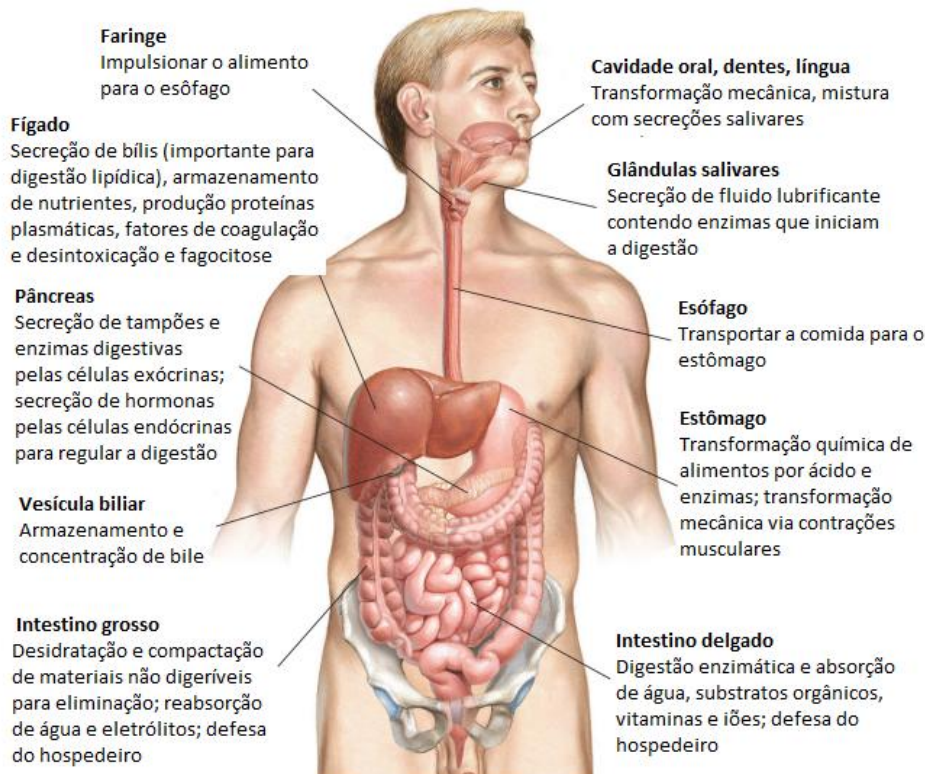


Figura 3. Trato gastrointestinal humano. (Adaptado de: (Treuting, Arends, & Dintzis, 2018))

1.6.1 Fases do processo de digestão

Considera-se, de forma teórica, que o processo de digestão pode ser dividido em três importantes fases: a fase oral, a fase gástrica e a fase intestinal.

1.6.1.1 Fase oral

Após o processo de ingestão, os alimentos entram na cavidade oral e inicia-se o processo de digestão. A fase oral inicia-se com a transformação mecânica, através da ação mastigatória e cortante dos dentes e da língua, a fim de promover a salivacção. A saliva é constituída por cerca de 99% de água, além de vários eletrólitos, incluindo sódio, potássio, cálcio e bicarbonato, mucinas e enzimas. A principal enzima encontrada na saliva é a α -amilase salivar, que promove a hidrólise do amido, nomeadamente as suas ligações glicosídicas α -1,4 (Bornhorst et al., 2016). Como resultado das transformações mecânicas e enzimáticas no final da fase oral obtém-se o bolo alimentar que é deglutido e transportado até ao estômago por movimentos peristálticos através do esôfago (Guerra et al., 2012).

1.6.1.2 Fase gástrica

O bolo alimentar ao chegar ao estômago, após o trânsito esofágico, entra em contacto com o suco gástrico, composto principalmente por enzimas, a pepsina e lipases responsáveis pela digestão de proteínas e lípidos respetivamente, por ácido clorídrico (HCl) responsável pela diminuição acentuada do pH (de aproximadamente pH 5-6 para pH 1,5), e por muco que protege as superfícies da membrana mucosa (Guerra et al.,

2012). A mistura do bolo alimentar com o suco gástrico é facilitada pelas contrações peristálticas das paredes musculares do estômago, resultando na diminuição gradual do pH (para aproximadamente 1,5 - 2), inativação da α -amilase salivar (pH ótimo 6 a 7) e ativação simultânea de enzimas gástricas, como a pepsina (pH ótimo 2 a 4) (Bornhorst et al., 2016). A pepsina é a enzima responsável pelo início da hidrólise de proteínas (Luo, Chen, Boom, & Janssen, 2018; Mat, Cattenoz, Souchon, Michon, & Le Feunteun, 2018). O pH pode diminuir drasticamente para um valor de pH 2 em cerca de 1-2h. Nesta fase a hidrólise não fica completa, esta apenas representa 10 a 15% da hidrólise total, por comparação com a que ocorre na fase intestinal (Mat et al., 2018).

Para além do referido anteriormente o estômago contribui também para a quebra das partículas de alimento presentes no bolo alimentar pela ação da pressão e forças mecânicas exercidas sobre as partículas provenientes das contrações musculares peristálticas no antro gástrico. Na extremidade distal do estômago, o piloro atua como crivo, permitindo que apenas partículas de dimensão aproximada <1 mm de diâmetro (designado como quimo) entrem no duodeno (Bornhorst et al., 2016). As partículas maiores são mantidas no estômago, por um mecanismo de retropulsão, para continuarem o processo de degradação (Guerra et al., 2012).

1.6.1.3 Fase intestinal

Nesta fase o quimo ácido, proveniente do estômago, chega ao intestino delgado; este é anatomicamente dividido em três partes: o duodeno, uma seção curta que recebe secreções digestivas do pâncreas e do fígado, e duas mais longas, o jejuno e o íleo. No intestino delgado ocorre a quebra de macromoléculas e a absorção de água e nutrientes. Nesta fase o pH é ajustado, devido à produção de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), de forma a ser o mais adequado para a atividade das enzimas cuja ação ocorre nesta fase. São várias as enzimas produzidas pelas paredes internas do intestino delgado, incluindo enzimas pancreáticas (protéases, amilases e lipases) e outras enzimas digestivas. A bÍlis é produzida pelo fígado e é nesta fase que desempenha um papel central na emulsificação das gorduras, através do aumento da área de contacto gordura-enzima que, conseqüentemente, promove a atividade das lipases pancreáticas (produzidas no pâncreas) (Guerra et al., 2012). Através deste processo, os lípidos provenientes da alimentação são mais facilmente absorvidos pelo epitélio intestinal (Maldonado-Valderrama, Wilde, Macierzanka, & Mackie, 2011).

Um dos órgãos mais importantes nesta fase da digestão, para além do fígado, é o pâncreas. Este é formado por dois tipos de glândulas que sintetizam, armazenam e segregam enzimas. As glândulas exócrinas produzem enzimas digestivas, tais como, lipase pancreática, amilase, fosfolipase e nucleases, libertadas no duodeno; já as glândulas endócrinas formadas por ilhéus de *Langerhans* segregam maioritariamente duas hormonas, glucagina e insulina, diretamente na corrente sanguínea, que irão regular a utilização de glicólise e lípidos nas células (Jouvet & Estall, 2017). Os principais processos digestivos (esvaziamento gástrico, trânsito intestinal, secreção de fluidos digestivos e muco e motilidade) são rigorosamente controlados por mecanismos de regulação hormonal e neural. Aproximadamente 70% das células imunes residem no trato digestivo [referido como tecido linfóide associado ao intestino *Gut Associated Lymphoid Tissue* (GALT)], desempenhando um papel importante no sistema imunológico (promovendo a defesa da mucosa intestinal) (Guerra et al., 2012).

Através dos movimentos peristálticos, o quimo mistura-se com as enzimas, promove a absorção de nutrientes através do contacto com a parede intestinal e impulsiona o conteúdo digerido até ao intestino delgado (Guerra et al., 2012). Em humanos saudáveis, 70 a 90% da digestão lipídica ocorre no intestino delgado (Sarkar, Ye, & Singh, 2016). O que não é absorvido chega ao intestino grosso. Este é dividido em três partes: o ceco, o colón e o reto, e as suas principais funções são a absorção de água e eletrólitos, a fermentação de polissacarídeos e proteínas por intermédio da microbiota presente no colón, a reabsorção de sais biliares e a formação, o armazenamento e a eliminação de fezes (Guerra et al., 2012).

1.7 Simulação do processo de digestão

O efeito que a digestão tem nos alimentos ingeridos, e consequentes efeitos na saúde humana, bem como as interações que ocorrem durante este processo podem ser estudados de forma indireta através de metodologias que simulem *in vivo* ou *in vitro* o processo de digestão. Os modelos *in vivo*, apesar de fornecerem informação mais precisa, têm como grande desvantagem o facto de serem dispendiosos e apresentarem limitações de natureza ética (Lucas-González et al., 2018). Por outro lado, os modelos *in vitro* apresentam a vantagem de serem mais rápidos, menos dispendiosos e trabalhosos e não estão sujeitos a restrições éticas (Minekus et al., 2014).

1.7.1 Modelos estáticos e modelos dinâmicos

O processo de simulação da digestão pode ser estudado através de dois tipos de modelos, os modelos estáticos e os modelos dinâmicos. Os modelos estáticos são mais simples, não têm em conta a absorção nem os processos físicos que ocorrem *in vivo*, como por exemplo a quebra de fragmentos maiores de alimentos, mistura e hidratação (Wickham, Faulks, & Mills, 2009). Estes modelos normalmente aplicam condições iniciais pré-estabelecidas, tais como, pH, concentração de enzimas, sais biliares, etc, para cada fase da digestão (Lucas-González et al., 2018). Envolvem a homogeneização dos alimentos, acidificação com ácido clorídrico, adição de enzimas e sais biliares seguidas de um compasso de espera que simula o tempo de digestão específico para cada fase e neutralização com carbonato ou hidróxido de sódio; todo o processo de simulação é executado sob agitação e mantido a 37 °C (Wickham et al., 2009). Em comparação com a digestão *in vivo*, estes modelos são estáticos uma vez que cada passo é feito sequencialmente, não há fluxo do alimento entre os diferentes compartimentos, mas apenas uma transferência para a próxima fase, uma vez a anterior esteja completa (Dupont, 2016).

Os modelos dinâmicos são mais sofisticados, têm em conta a transformação física dos alimentos e as mudanças que ocorrem durante o processo de simulação, pretendendo simular as condições *in vivo*. Possibilitam uma visão holística de todo o processo de digestão onde os produtos da mesma podem ser removidos ou não (Wickham et al., 2009). A conceção destes modelos pode variar, principalmente em termos de geometria (por exemplo, alinhamento vertical ou horizontal), bioquímica (diferentes secreções digestivas são adicionadas aos compartimentos do modelo ao longo do tempo) e nas forças físicas aplicadas (simuladas usando por exemplo rolos de Teflon ou discos flexíveis) (Lucas-González et al., 2018). Podem ainda ser monocompartmentais, simulam apenas um compartimento do trato gastrointestinal, ou

multicompartmentais, quando simulam vários compartimentos. O primeiro modelo monocompartmental desenvolvido foi o *Dynamic Gastric Model* (DGM), criado pelo *Institute of Food Research in Norwich*, no Reino Unido, e pretende simular duas regiões do estômago, o fundo e o antro. Os principais objetivos eram estudar a bioacessibilidade dos nutrientes, o efeito da matriz/estrutura alimentar no fornecimento de nutrientes, as interações entre os nutrientes e o comportamento dos alimentos funcionais. O modelo multicompartmental mais conhecido atualmente é o modelo TIM, desenvolvido na década de 1990 por cientistas da *Netherlands Organisation for Applied Scientific Research* (TNO), e simula o trato gastrointestinal superior (TIM-1). Pouco tempo depois foi desenvolvido um modelo que simula o intestino grosso (TIM-2), estando estes modelos continuamente a sofrer atualizações de forma a otimizar o seu desempenho e a ter novas aplicações. Outros exemplos de sistemas multicompartmentais utilizados são o DIDGI (desenvolvido no *Institut National de la Recherche Agronomique*, INRA), o SIMGI (desenvolvido no *Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación*, CIAL, Madrid, Espanha), o SHIME (desenvolvido na *Universiteit Gent*, Bélgica) e o ESIN (desenvolvido na *Université Clermont Auvergne*, Clermont-Ferrand, França) que vem superar algumas limitações dos sistemas TIM e SHIME. A maioria dos sistemas dinâmicos comercialmente disponíveis, DGM, TIM e SHIME, foram validados com sucesso para a simulação das condições de digestão em humanos e animais (Dupont, 2016).

Alguns exemplos das principais aplicações destes modelos dinâmicos, na avaliação da digestão de proteínas lácteas e/ou a sua bioatividade, estão representados na Tabela 6.

Tabela 6. Complexidade do modelo dinâmico e aplicação ao leite e digestão de laticínios. (Adaptado de (Giromini, Cheli, Rebucci, & Baldi, 2019))

Modelo dinâmico	Origem/Localização	Complexidade	Aplicação	Referência
DGM	Institute of Food Research (Norwich, UK)	Monocompartmental (digestão gástrica)	Digestão de proteínas do leite - abordagem proteômica	(Q. Zhang et al., 2014)
HGS	University of California (Davis)	Monocompartmental (digestão gástrica)	Hidrólise de proteína de soro de leite	(Guo, Ye, Lad, Dalgleish, & Singh, 2014)
TIM-1	TNO (the Netherlands)	Multicompartmental (digestão gástrica e intestinal)	Digestão do extrato de proteína de soro de leite	(Nabil, Gauthier, Drouin, Poubelle, & Pouliot, 2011)
SIMGI	Institute of Food Science Research CIAL (CSIC-UAM, Madrid, Spain)	Multicompartmental (estômago, intestino delgado e microbiota do colón)	Digestão do concentrado proteico do soro de leite	(Miralles, del Barrio, Cueva, Recio, & Amigo, 2018)
DIDGI system	INRA (Paris, France)	Multicompartmental (digestão gástrica e do intestino delgado)	Mapeamento de peptídeos; Proteólise do leite; Bioacessibilidade intestinal de AA	(de Oliveira, Bourlieu, et al., 2016; de Oliveira, Deglaire, et al., 2016; Sánchez-Rivera, Ménard, Recio, & Dupont, 2015)
SHIME	Ghent University (Ghent, Belgium)	Multicompartmental (digestão intestinal gástrica, pequena e grande)	Efeito de retenção do soro de leite na população microbiana	(Meddah et al., 2001)

Na Tabela 7 apresenta-se a comparação dos dois modelos de digestão, estáticos e dinâmicos, considerando o tipo de estudo que se pretende desenvolver, o tipo de alimento, as principais aplicações, objetivos e vantagens e desvantagens.

Tabela 7. Comparação entre modelos estáticos e dinâmicos de simulação da digestão humana *in vitro*. (Adaptado de (Lucas-González et al., 2018))

Modelos Estáticos	Modelos Dinâmicos
Tipo de estudo	
Útil para estudar as fases da digestão isoladamente (fase gástrica e/ou intestinal)	Aplicável a estudos que simulem toda a digestão (digestão completa)
Tipo de alimento	
Alimentos simples/homogeneizados	Matriz alimentar complexa
-Componentes individuais dos alimentos isolados ou purificados (por exemplo nutrientes essenciais e compostos bioativos)	
Principais aplicações	
Estudo da digestão de macronutrientes	Alimentos e indústria farmacêutica
-Hidrólise de proteínas	-Libertação e bioacessibilidade de nutrientes de matrizes alimentares complexas
-Hidrólise lipídica	-Digestão de proteínas
-Resistência à degradação do amido	-Separação lipídica
Estudo da digestão de moléculas bioativas	-Produção de péptidos
-Libertação a partir de matrizes alimentares simples	
-Solubilidade e bioacessibilidade	
Principais objetivos	
Melhorar as propriedades dos alimentos	Efeito da estrutura alimentar na distribuição de nutrientes, interações de nutrientes, etc.
-Ensaio preliminares para justificar possíveis alegações nutricionais e de saúde	
Principais vantagens	
Rápido e simples	Melhor representação do ambiente dinâmico do intestino:
-Economicamente viáveis	-Movimentos peristálticos, forças físicas, forças de cisalhamento, etc.
-Validados tendo em conta a utilização prevista	-Comparação direta com os resultados de estudos <i>in vivo</i> /clínicos
Principais desvantagens	
Ausência de forças mecânicas que contribuem para a digestão <i>in vivo</i> e as constantes mudanças no ambiente bioquímico; excessiva acumulação de metabólitos, que pode interferir com a digestão	Necessidade de extensa validação

A multiplicidade de modelos *in vitro* desenvolvida nos últimos anos tem demonstrado ser uma excelente ferramenta para comparar a digestão de diferentes alimentos de composição semelhante, compreender os mecanismos de digestão dos alimentos, simular a resistência dos probióticos no trato gastrointestinal ou reforçar o

conhecimento relativamente ao impacto dos alimentos na microbiota intestinal (Dupont, 2016).

1.7.2 Modelos de digestão *in vitro*

Os modelos de digestão *in vitro* têm sido utilizados no âmbito de diferentes disciplinas, incluindo a nutrição, a toxicologia e a farmacologia. O recente desenvolvimento destes modelos permite mimetizar as condições físico-químicas do trato gastrointestinal, onde se incluem as condições enzimáticas e de pH encontradas na boca, estômago e intestino (Figura 4), designadas genericamente por fase oral, fase gástrica e fase intestinal (Bornhorst et al., 2016; Minekus et al., 2014). Contudo, é ainda difícil simular com precisão os complexos efeitos físico-químicos do ambiente no trato gastrointestinal (Bornhorst et al., 2016), sendo difícil representar toda a variabilidade verificada em cada indivíduo no que concerne à secreção enzimática criada pela regulação hormonal, peptídica e neural (Bornhorst et al., 2016; Ulleberg et al., 2011).

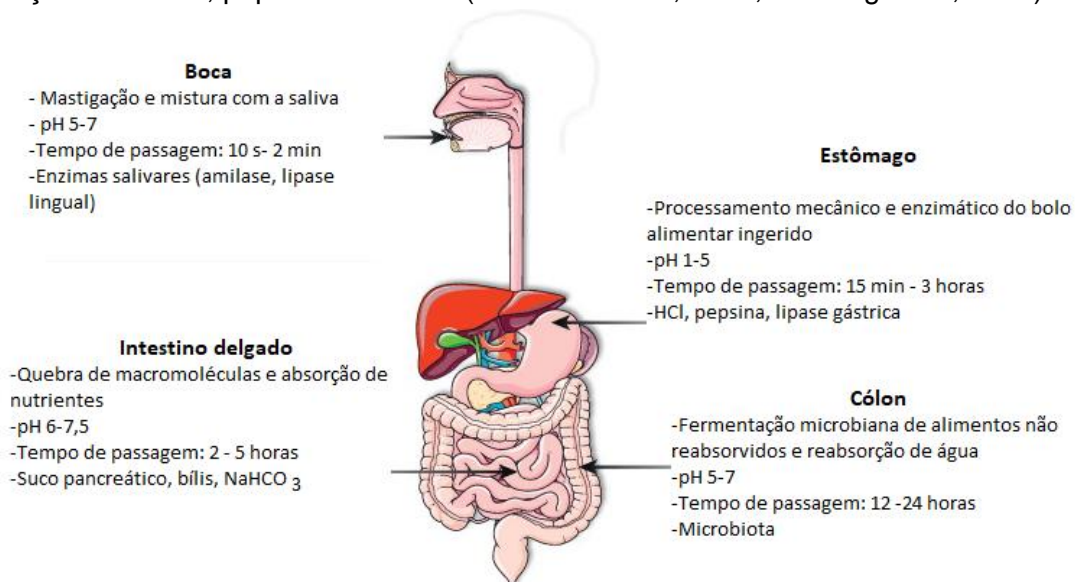


Figura 4. Características específicas de cada um dos principais órgãos do trato gastrointestinal humano. (Adaptado de (Guerra et al., 2012))

Por forma a ultrapassar as dificuldades decorrentes da existência de diferentes metodologias para simulação da digestão *in vitro*, nomeadamente na comparação de resultados obtidos por diferentes grupos de investigação, foi desenvolvido no âmbito da Cost Action INFOGEST (<https://www.cost-infogest.eu/>) um modelo de digestão harmonizado, que reúne um conjunto de condições padrão próximas das condições fisiológicas e que veio contribuir para a produção de dados mais fiavelmente comparáveis entre estudos (Minekus et al., 2014). Tendo por base resultados obtidos previamente em ensaios *in vivo* e realizados em humanos, bem como o conhecimento de vários especialistas na área, foi publicado em 2014 um modelo estático básico que simula o processo de digestão humana, dividido em três fases, a fase oral, a fase gástrica e a fase intestinal, e com parâmetros padronizados para cada uma das fases (Tabela 6) (Dupont, 2016; Egger et al., 2016). É um modelo flexível, preciso e reprodutível (Minekus et al., 2014).

Tabela 8. Condições experimentais definidas no modelo de digestão *in vitro* harmonizado no âmbito da INFOGEST. (Adaptado de (Brodkorb et al., 2019; Dupont, 2016; Egger et al., 2016; Minekus et al., 2014))

Fase	pH	Duração	Diluição	Enzimas digestivas e complementos
Oral	7	2 minutos	1:1 com FSS ¹	Amílase salivar: 75 U/mL
Gástrica	3	2 horas	1:1 com FGS ²	Pepsina: 2000U/mL
Intestinal	7	2 horas	1:1 com FIS ³	Tripsina: 100 U/mL Quimotripsina: 25 U/mL Lípase pancreática: 2000 U/mL Colipase (relação molar de 2:1 M com lípase) Amílase pancreática: 2000 U/mL Bile: 10 mM Ou Pancreatina (com base na atividade de tripsina a 100 U/mL) Bile 10 mM

¹FSS, Fluido Salivar Simulado; ²FGS, Fluido Gástrico Simulado; ³FIS, Fluido Intestinal Simulado

Apesar de aparentemente simples, este modelo é considerado adequado para comparar o comportamento de diferentes amostras em condições gastrointestinais semelhantes, para estudar a digestão de compostos ou para esclarecer a complexidade das interações a nível molecular (Dupont, 2016). Desde a sua publicação, em 2014, tem sido amplamente utilizado e aplicado em diversas áreas de investigação resultando na necessidade de se esclarecer alguns aspetos do protocolo original (Egger et al., 2016) conduzindo à elaboração de um protocolo melhorado, o INFOGEST 2.0, que foi publicado recentemente (Brodkorb et al., 2019).

2. Objetivos

Os alimentos fermentados para além de apresentarem um maior tempo de conservação, quando comparados com a matéria-prima original, são também reconhecidos como um meio de obtenção de microrganismos que conduzem a efeitos benéficos para a saúde humana. Estes microrganismos, designados por probióticos, devem estar presentes em quantidade suficiente no produto e serem capazes de sobreviver ao processo de digestão por forma a produzirem os benefícios expectáveis. Deste modo, os principais objetivos deste trabalho foram:

- Caracterizar microbiologicamente diferentes alimentos fermentados, apresentando uma matriz alimentar semelhante, através da quantificação de bactérias LAB e da identificação de bactérias LAB isoladas a partir dos mesmos;
- Comparar o desempenho de dois métodos de contagem do número de bactérias LAB presentes em alimentos fermentados;
- Avaliar a sobrevivência das bactérias LAB presentes em alimentos fermentados durante o processo de digestão humana, aplicando para este efeito a metodologia harmonizada de simulação da digestão humana *in vitro*.

3. Materiais e métodos

O presente estudo foi realizado no Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Conforme esquematizado na Figura 5, por forma a atingir os objetivos estabelecidos, foram considerados diferentes ensaios organizados em três etapas.

Na primeira etapa foram identificados os alimentos lácteos fermentados e seus similares de origem vegetal disponíveis no mercado português. Após a sua identificação, foi estabelecido um plano de amostragem, selecionando alguns desses alimentos, por forma a refletir a variedade acessível aos consumidores em Portugal.

Na segunda etapa procedeu-se à caracterização microbiológica das amostras selecionadas, primeiramente através da comparação entre dois métodos de quantificação microbiológica, sendo um normalizado, de contagem em meio sólido utilizando-se meio de cultura MRS agar, e o outro alternativo, que consiste num método automatizado utilizando-se o sistema TEMPO® LAB.

Na terceira etapa foi utilizado o modelo harmonizado de simulação da digestão humana *in vitro*, descrito pela INFOGEST, com o objetivo de avaliar a sobrevivência das bactérias LAB ao processo de digestão humana. A contagem do número de bactérias LAB foi efetuada antes e após a simulação da digestão pela metodologia de contagem em placa, em meio MRS agar. As bactérias isoladas dessas amostras foram identificadas utilizando o sistema automatizado VITEK® MS.

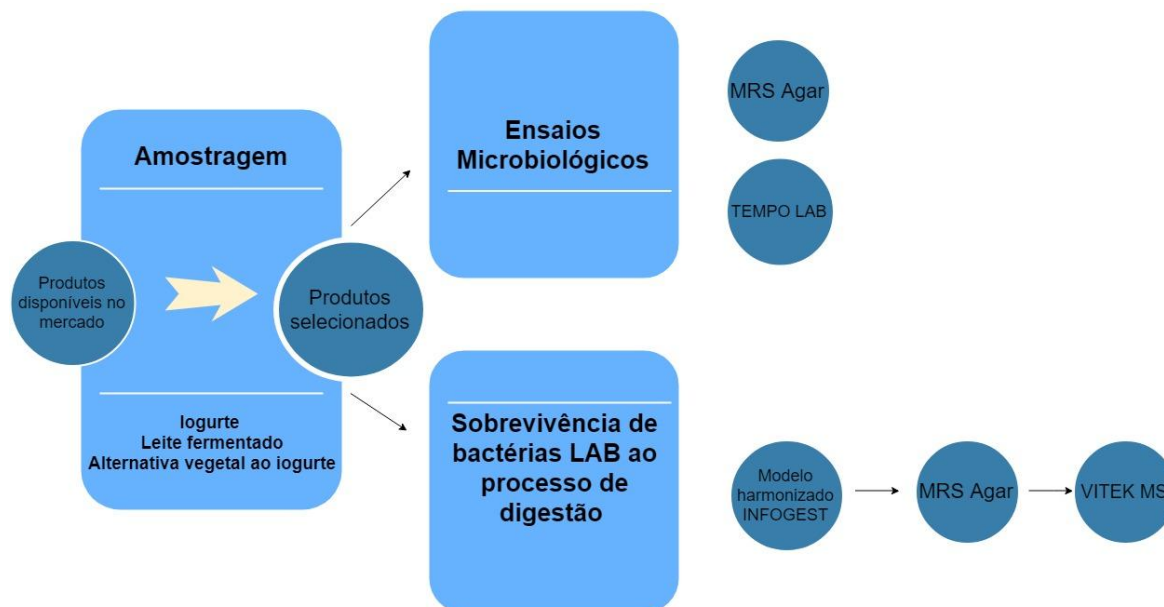


Figura 5. Esquema das etapas consideradas no desenho experimental.

3.1 Amostragem

3.1.1 Plano de amostragem

Por forma a estabelecer o plano de amostragem a considerar no presente estudo, foi efetuado um levantamento de produtos fermentados disponíveis em diferentes superfícies comerciais na região de Lisboa, através das suas páginas web, quando disponíveis, e/ou de visitas presenciais. Assim foi estabelecido um plano de amostragem utilizando como principal critério de seleção dos produtos a obtenção de uma amostragem significativa da diversidade de produtos fermentados acessível aos consumidores, tendo em conta as principais características deste tipo de alimentos, como: tipo (sólido, batido, líquido), composição (natural, açucarado, aromatizado), matéria gorda (gordo, meio gordo, magro), matriz alimentar (leite de vaca, bebida de soja), marca de fabricante *versus* marca própria e se são ou não suplementados com bactérias probióticas.

3.1.2 Caracterização das amostras

A amostragem pretendeu incluir produtos fermentados classificados como sendo iogurte, leite fermentado e alternativa vegetal ao iogurte. O iogurte padrão, conforme definido na Portaria nº 742/92 de 24 de Julho, (Anónimo, 1992) pode ser adaptado por forma a se obterem diferentes variantes deste mesmo produto, como é o caso do iogurte bífidos, iogurte grego e iogurte skyr. O kefir pode ser comercializado como iogurte kefir ou leite kefir consoante o seu tipo. A Tabela 9, apresenta as categorias de produtos incluídos no plano de amostragem e o respetivo número de amostras, estando as principais características de cada uma das amostras apresentadas no Anexo 1. Todas as amostras incluídas no plano de amostragem foram analisadas para quantificar o número de LAB.

Tabela 9. Número de amostras incluídas no plano de amostragem por categoria de produto.

Produto	Nº Amostras
logurte padrão	17
logurte bífidos	11
logurte grego	6
logurte skyr	5
Leite fermentado - Kefir	2
Alternativa vegetal ao iogurte	4
TOTAL	45

De entre os produtos identificados inicialmente selecionaram-se seis (Tabela 10) para avaliar a sobrevivência das LAB ao processo de simulação da digestão *in vitro*. Consideram-se iogurtes padrão (amostras A e B), iogurtes bífidos (amostras C e D), uma alternativa vegetal ao iogurte (amostra E) e um iogurte skyr (amostra F).

Tabela 10. Caracterização dos alimentos utilizados para avaliação da sobrevivência da flora probiótica durante o processo de digestão humana *in vitro*.

Amostra	Tipo	Composição	Matéria gorda	Matriz alimentar	Marca	Suplementação
A	Sólido	Natural	Meio gordo	Leite de vaca	Marca de fabricante	Fermentos lácticos
B	Sólido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
C	Sólido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca de fabricante	Fermentos lácticos e Bifidobactérias
D	Sólido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos e Bifidobactérias
E	Sólido	Natural	Meio gordo	Bebida de soja	Marca de fabricante	Fermentos lácticos e Bifidobactérias
F	Batido	Natural	Magro	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos

3.2 Ensaios microbiológicos em iogurtes e outros alimentos fermentados

3.2.1 Materiais e equipamentos

Para a quantificação de LAB nas 45 amostras ensaiadas, foram utilizados dois métodos:

- Incorporação em MRS agar (baseado nas formulações de Man, Rogosa e Sharpe) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England), tendo-se utilizado triptona sal (Biokar Diagnostics Beauvais, France) e sistema de anaerobiose (caixa, gerador e indicador de anaerobiose bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)

- Sistema automatizado TEMPO® LACTIC ACID BACTERIA (LAB) (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)

Para incubação foram utilizadas estufas a 37 °C ± 1 °C (Panasonic, Gunma, Japan).

Para a identificação das bactérias, utilizou-se o sistema VITEK® MS (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) e VITEK® 2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France).

3.2.2 Preparação das amostras

A superfície exterior das embalagens foi previamente desinfetada com álcool a 70% e todas as etapas seguintes dos procedimentos foram realizadas em condições de assepsia e de acordo com as normas ISO 7218 (ISSO, 2007) e ISO 6887-5 (ISSO, 2010).

3.2.3 Quantificação de bactérias do ácido-láctico (LAB)

3.2.3.1 Quantificação em meio sólido (MRS agar)

O método de incorporação em MRS agar foi efetuado conforme a norma ISO 7218:2007, tendo-se realizado diluições decimais de acordo com o nível de contaminação expectável, seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) e em tubos com 9 mL de triptona sal. De cada diluição foi considerado um volume de 1ml que foi incorporado em placas de *Petri* com meio MRS agar e posteriormente incubadas em jarras de anaerobiose durante 48 horas ± 2 horas a 37 °C ± 1 °C. Após incubação, as colónias foram contadas e o resultado calculado pela média ponderada através da seguinte fórmula:

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

Onde, N é o número de ufc presentes em cada amostra, $\sum C$ é o somatório das colónias contadas em duas placas com diluições decimais sucessivas, em que pelo menos uma delas apresente um mínimo de 10 colónias, V é o volume de inóculo semeado em cada placa em mililitros e d corresponde à taxa de diluição correspondente à primeira diluição considerada. De acordo com a norma ISSO 7218 (ISSO, 2007), só são contabilizadas placas com um máximo de 300 colónias; placas com valores acima deste são consideradas como *Incontáveis (Inc)*. Para casos em que apenas se obteve contagens numa das diluições foi aplicada a seguinte fórmula:

$$N = \frac{C}{V \times d}$$

Onde, C é o número de colónias contadas, V o volume semeado e d o fator de diluição da respetiva placa.

3.2.3.2 Quantificação por método alternativo TEMPO® LAB

O método TEMPO® é um sistema automatizado de quantificação de indicadores de qualidade nos produtos alimentares e é composto por um conjunto de cartas TEMPO® (miniaturização do método do “Número Mais Provável”) e meio de cultura desidratado seletivo. Para a quantificação de bactérias do ácido-láctico utilizou-se o TEMPO® LACTIC ACID BACTERIA (LAB). De cada amostra, previamente homogeneizada, foram feitas diluições sucessivas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) em tubos com 9 ml de triptona sal. Para todos os casos foi considerado um volume de 0,1 ml de cada uma das

diluições, adicionado ao meio de cultura e seguidamente incorporado nas cartas, através do equipamento TEMPO® Filler. As cartas são constituídas por 3 séries de 16 poços cada, com diferença de volume de 1 logaritmo entre cada série. Depois de inoculadas e seladas, as cartas TEMPO® foram incubadas entre 40-48 horas a 37 °C ± 1 °C, e posteriormente lidas no equipamento TEMPO® Reader. Recorrendo a métodos estatísticos e em virtude do meio de cultura conter um indicador fluorescente, o aparelho de leitura deteta TEMPO® Reader com base no volume e no número de poços positivos (fluorescentes e não fluorescentes) o número de microrganismos presentes na amostra inicial, exprimindo os resultados em ufc/g.

3.2.4 Identificação de espécies de bactérias através do sistema VITEK® MS

O sistema VITEK® MS é um sistema de identificação microbiana de espectrometria de massa automatizado que utiliza a tecnologia de ionização e desorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo/tempo de chegada da substância ao detetor (MALDI-TOF MS), do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*.

Para a preparação da lâmina a ser analisada pelo sistema VITEK® MS, selecionou-se uma colónia isolada de cada placa utilizada para a quantificação de LAB após simulação do processo de digestão *in vitro*; adicionou-se a amostra a uma matriz polimérica (α -CHCH), contida numa placa, pronta a usar, e inseriu-se no aparelho VITEK® MS. A placa foi irradiada com um laser que vaporiza e ioniza a amostra. Foi gerado um espectro característico para cada microrganismo, que é convertido numa percentagem de probabilidade e num valor de confiança; este é comparado com a base de dados disponível no sistema, o que permite identificar qual é o microrganismo em questão. Para a validação do resultado obtido com uma das amostras utilizou-se o sistema automatizado VITEK® 2. Este sistema faz a identificação microbiana (ID) através de cartas ID VITEK® 2. Para o isolamento dos microrganismos em meio agar sangue utilizou-se a placa de *Petri* inoculada anteriormente. O inóculo é colocado na cassete VITEK® 2 Smart Carrier Station™, onde a carta e a amostra são associadas virtualmente; a incubação e a leitura são geradas automaticamente pelo sistema.

3.3 Avaliação da sobrevivência de bactérias do ácido-láctico (LAB) durante o processo de simulação da digestão *in vitro*

3.3.1 Materiais e equipamentos

Os reagentes utilizados foram os seguintes: Pancreatina (Sigma-Aldrich, P7545); α -amilase salivar humana (Sigma-Aldrich, 1031); Pepsina suína (Sigma-Aldrich, P7012); Tripsina suína (Sigma-Aldrich, T0303); Quimotripsina (Sigma-Aldrich, C7762); α -amilase pancreática (Sigma-Aldrich, C3176); Lípase intestinal porcina (Sigma-Aldrich, 3126); Co lípase (Sigma-Aldrich, C3028); Bílis (Sigma-Aldrich, P8631); $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (Merck 2382); NaOH (Merck 9141); HCl (J. T. Baker 6081); KCl (Merck 4936); KH_2PO_4 (J. T. Baker 0240); NaHCO_3 (Merck 6329); NaCl (Merck 6404); $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ (Merck 5833); $(\text{NH}_4)\text{CO}_3$ (Sigma-Aldrich, 207861); água ultrapura, gerada por um sistema *Milli Q* Gradient A10 (Millipore® (Molsheim, France), referida no texto como água.

Foi utilizada uma estufa de incubação (Termaks, B8000) e um agitador de rotação Heidolph, Reax 2.

3.3.2 Simulação do processo da digestão humana *in vitro*

3.3.2.1 Preparação das soluções dos fluidos digestivos simulados (FDS)

Para a preparação dos fluidos digestivos simulados (FDS) foram necessárias soluções *stock* de eletrólitos, enzimas, CaCl_2 e água. De modo a obter a constituição final dos fluidos digestivos, as soluções *stock* de eletrólitos foram preparadas para um fator de concentração de 1,25x. Utilizaram-se os seguintes reagentes para a preparação dos FDS: $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})$, KCl, NaHCO_3 , NaCl, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, NaOH (Merck, Darmstadt, Germany), $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), KH_2PO_4 , e HCl (J. T. Baker, Center Valley, PA, USA). A Tabela 11 apresenta a composição final de cada FDS. Os FDS (1,25x) foram armazenados a -20°C até à sua utilização para simulação da digestão (Minekus et al., 2014).

Tabela 11. Composição de cada um dos fluidos digestivos simulados (FDS) utilizados no processo de digestão *in vitro*. (Adaptado de (Minekus et al., 2014))

Sol. de sais adicionados	Conc. das soluções stock	FSS (pH7)			FGS (pH3)			FIS (pH7)		
		mL de sol. stock adicionados para preparar 0,250L (1,25x)	Conc. final de sais no FSS	mL de sol. stock adicionados para preparar 0,500L (1,25x)	Conc. final de sais no FGS	mL de sol. stock adicionados para preparar 1,0L (1,25x)	Conc. final de sais no FIS			
	g/L	mol/L	mL	mmol/L	ml	mmol/L	ml	mmol/L		
KCl	37,3	0,5	9,4	15,1	8,6	6,9	17,0	6,8		
KH_2PO_4	68	0,5	2,3	3,7	1,1	0,9	2,0	0,8		
NaHCO_3	84	1	4,3	13,6	15,6	25	106,3	85		
NaCl	117	2	-	-	14,8	47,2	24,0	38,4		
$\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$	30,5	0,15	0,31	0,15	0,5	0,12	2,8	0,33		
$\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$	48	0,5	0,04	0,06	0,6	0,5	-	-		
$\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$	44,1	0,3		1,5	0,3	0,15		0,6		
HCl		1	0,3	1,1	9,8	15,6	10,5	8,4		

FSS, Fluido Salivar Simulado; FGS, Fluido Gástrico Simulado; FIS, Fluido Intestinal Simulado

3.3.2.2 Preparação dos tubos teste

A utilização dos tubos teste permite determinar, previamente e para cada matriz alimentar, os volumes das soluções de NaOH a 1 M e de HCl a 1 M necessários para ajustar o pH de cada ensaio para os valores de pH estabelecidos no protocolo (fase gástrica, pH=3; fase intestinal, pH=7). Deste modo, otimiza-se o tempo de realização do

ensaio uma vez que se elimina a necessidade de se fazerem leituras e ajustes de pH durante os ensaios de simulação da digestão. Os ensaios dos tubos teste foram realizados para cada amostra considerada e por forma a estabelecer previamente os volumes necessários de NaOH e de HCl a adicionar a cada um dos tubos durante a simulação da digestão. Em cada tudo foram recriadas as condições descritas no protocolo de digestão *in vitro*, com exceção da não utilização das enzimas.

3.3.2.3 Protocolo de simulação da digestão *in vitro*

O procedimento foi realizado de acordo com o método descrito por Minekus et al., 2014 e por Brodkorb et al., 2019 para o modelo padronizado de digestão humana *in vitro*. Neste ensaio experimental, para cada uma das amostras foram efetuados três ensaios independentes (n=3) (Tabela 10).

Relativamente à fase oral, a 1 g de amostra foi adicionado FSS, CaCl₂, α-amilase salivar e H₂O, a fim de se obter um volume final de 2 mL. Os tubos com as soluções foram incubados em estufa a 37 °C ± 1 °C, durante 2 minutos e em agitação constante. De seguida, procedeu-se à simulação da fase gástrica, em que aos 2 mL da mistura obtida no final da fase oral foram adicionados FGS, CaCl₂, pepsina, HCl e H₂O, obtendo-se um volume final de 4 mL. Os tubos foram incubados a 37 °C ± 1 °C, durante 120 minutos e em agitação constante. Decorrido este tempo, procedeu-se à simulação da fase intestinal tendo-se adicionado aos 4 mL da mistura anterior FIS, CaCl₂, pancreatina, bÍlis, NaOH, e H₂O obtendo-se um volume final de 8 mL. Os tubos foram colocados a 37 °C ± 1 °C, durante 120 minutos e em agitação constante. Após o tempo de incubação, procedeu-se de imediato à inoculação de cada uma das amostras em placas de MRS agar para posterior quantificação de microrganismos LAB, conforme descrito em “3.2.3.1 Quantificação em meio sólido (MRS agar)”.

3.3.3 Análise estatística

Previamente à análise estatística dos resultados obtidos, procedeu-se à codificação das variáveis categóricas (tipo, composição, matéria gorda, matriz alimentar, marca e suplementação) bem como à conversão para logaritmo decimal das contagens obtidas, quer na caracterização dos teores de bactérias dos produtos analisados quer nas contagens obtidas antes e após a simulação do processo de digestão *in vitro*. A análise estatística dos resultados obtidos foi efetuada utilizando o software IBM® SPSS Statistics 20 (IBM, Armonk, NY). Em todas as análises, o nível de significância considerado foi de 5%. Os restantes cálculos e os gráficos foram obtidos através do software Microsoft Excel 2016.

De modo a perceber a significância estatística das comparações efetuadas ao longo do presente trabalho foram efetuados diferentes testes estatísticos não-paramétricos, dependendo das hipóteses a analisar: teste de Wilcoxon (comparação de duas amostras emparelhadas), teste de Friedman (comparação de mais de duas amostras emparelhadas), teste de Mann-Whitney (comparação duas amostras independentes) e teste de Kruskal-Wallis (comparação de mais de duas amostras independentes). Os ensaios de simulação da digestão foram realizados em triplicado.

4.Resultados

4.1 Comparação dos métodos de contagem MRS agar e TEMPO® LAB

A Tabela A2 incluída no Anexo 2, evidencia os valores das contagens de LAB utilizando os métodos MRS agar e TEMPO® LAB, nas 45 amostras ensaiadas e a média e desvio padrão dos resultados obtidos através dos dois métodos.

Com o objetivo de avaliar o desempenho na contagem de bactérias LAB em alimentos fermentados duas metodologias foram comparadas: MRS agar e TEMPO® LAB. Conforme apresentado na Figura 6 a média das contagens obtidas pelo método utilizando o meio MRS agar foi superior, quando comparada com a média dos resultados obtidos com o TEMPO® LAB, apresentando uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$). Dos resultados obtidos apenas duas exceções foram verificadas, nomeadamente num iogurte bífidos e numa alternativa vegetal ao iogurte de bífidos.

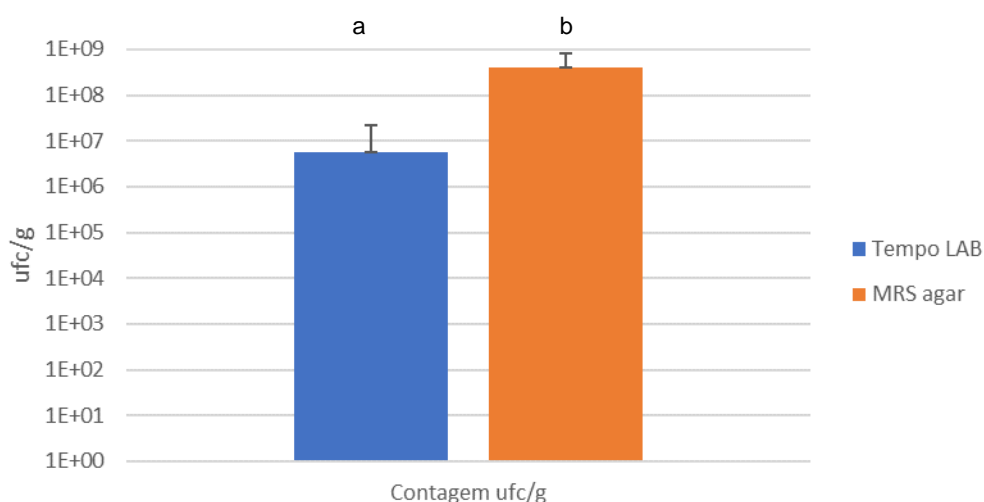


Figura 6. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos nas 45 amostras de alimentos fermentados, utilizando duas metodologias: TEMPO® LAB e MRS agar. Letras diferentes (a e b) representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Individualizando os valores obtidos por categoria de produto, a Figura 7 resume a média dos valores obtidos com os dois métodos considerados. Como é observável os valores obtidos com o método de contagem em placa foram superiores para todas as categorias de produtos analisados.

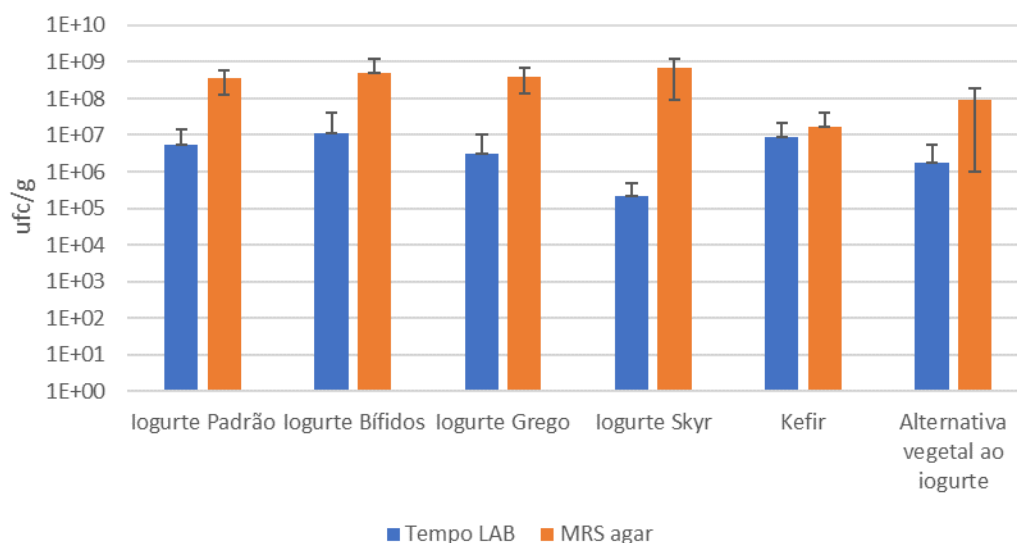


Figura 7. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos nas 45 amostras de alimentos fermentados, analisado por categoria.

No caso do iogurte padrão uma das amostras de marca própria e duas de marca de fabricante, pertencendo à mesma marca mas variando no teor de gordura, obtiveram contagens na mesma ordem de grandeza entre os dois métodos; já com as restantes amostras os valores foram muito discrepantes entre os dois métodos, com variações de contagens entre 10^4 ufc/g e 10^8 ufc/g. Nos iogurtes bífidos e de marca de fabricante, apenas no do tipo líquido os valores obtidos com os dois métodos foram da mesma ordem de grandeza. Tanto no caso dos iogurtes grego como no caso dos iogurtes skyr os resultados entre os procedimentos foram muito divergentes, sendo que com o MRS agar os valores obtidos foram bastante mais elevados. Para as amostras de kefir os resultados obtidos são concordantes para ambos os métodos, não existindo uma variação significativa de valores de contagens entre os dois métodos. Para as alternativas vegetais ao iogurte, analisaram-se amostras do tipo sólido e do tipo líquido, sendo que os resultados obtidos para o tipo líquido foram concordantes entre os dois métodos. Verificou-se ainda que para os alimentos fermentados do tipo líquido os resultados foram mais coerentes entre os dois métodos utilizados.

Considerando os resultados de performance obtidos com os dois métodos, apenas se utilizou o método MRS agar para os ensaios subsequentes, nomeadamente para a análise estatística da caracterização microbiológica das amostras consideradas e para os ensaios de avaliação da sobrevivência aos ensaios de digestão *in vitro*.

4.2 Caracterização microbiológica dos diferentes alimentos fermentados

As Figuras 8, 9, 10, 11, 12 e 13 apresentam os resultados obtidos relativamente à contagem de LAB considerando os diferentes parâmetros de amostragem definidos inicialmente (tipo, composição, teor de gordura, matriz alimentar, marca e suplementação).

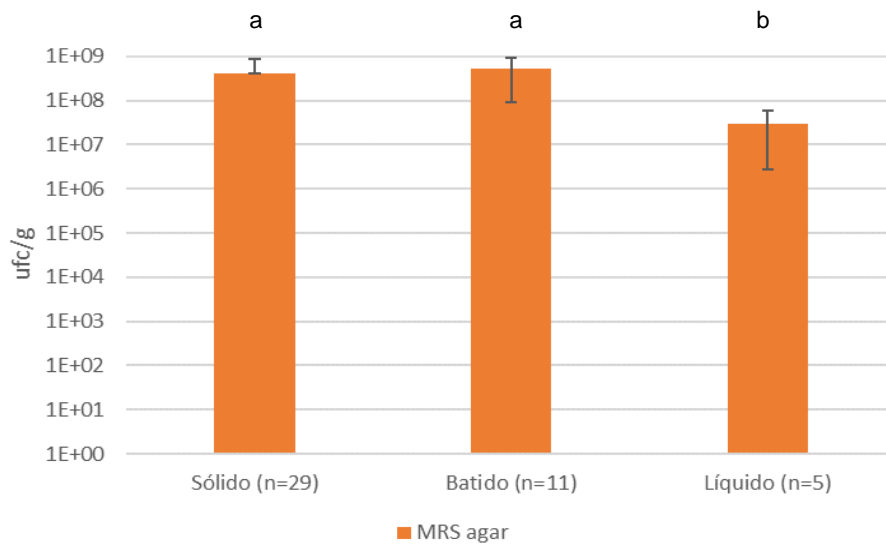


Figura 8. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para as 45 amostras de alimentos fermentados, segundo o seu tipo (sólido, batido e líquido). Letras diferentes (a e b) representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Conforme apresentado na Figura 8 os alimentos fermentados do tipo líquido apresentaram valores de contagens semelhantes. Os resultados obtidos evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tipos ($p < 0,008$). Quando comparados os diferentes tipos entre si, os tipos sólido e batido não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,455$, ou seja, $p > 0,05$); no caso dos tipos sólido e líquido ($p = 0,001$, ou seja, $p < 0,05$) e líquido e batido ($p = 0,009$, ou seja, $p < 0,05$), as diferenças foram estatisticamente significativas.

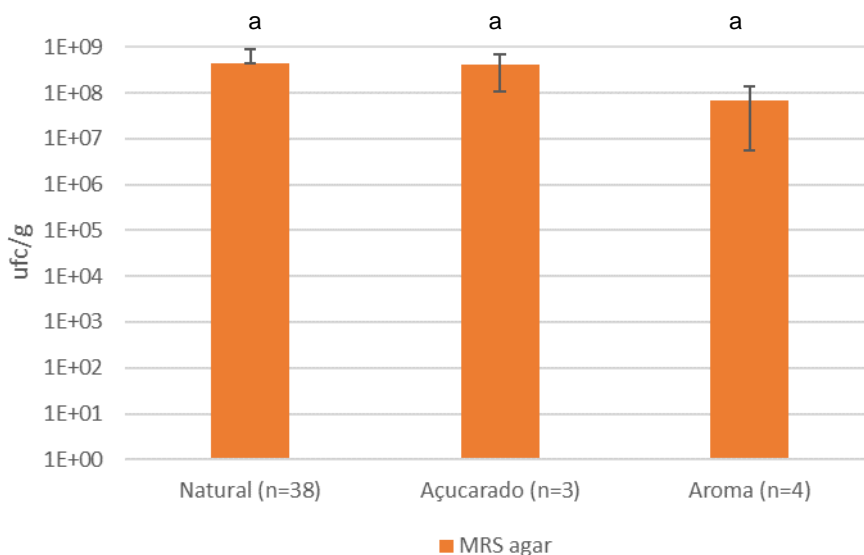


Figura 9. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para as 45 amostras de alimentos fermentados, segundo a sua composição (natural, açucarado e aroma). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (a) ($p > 0,05$).

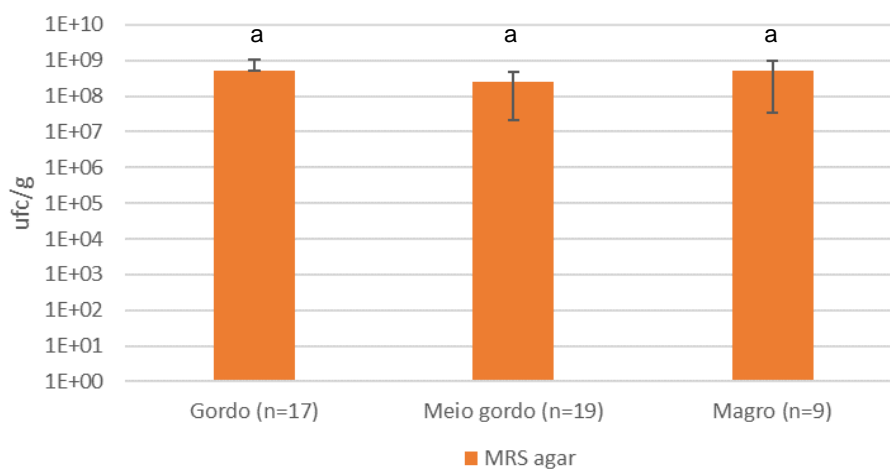


Figura 10. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para as 45 amostras de alimentos fermentados, segundo o teor de gordura (gordo, meio gordo, magro). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (a) ($p > 0,05$).

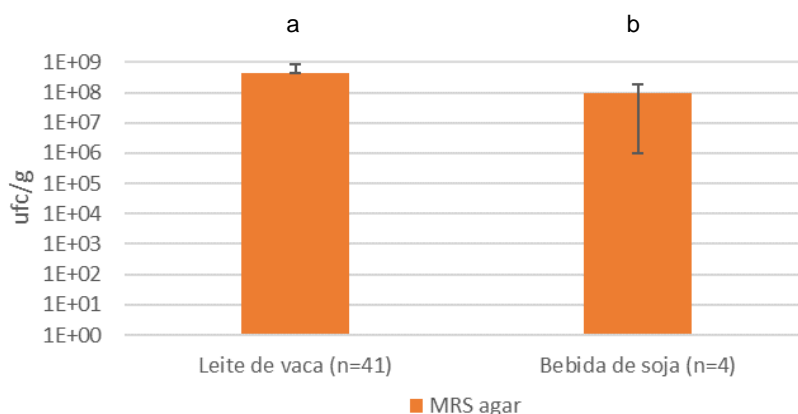


Figura 11. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para as 45 amostras de alimentos fermentados, segundo a matriz alimentar (leite de vaca e bebida de soja). Letras (a e b) apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os alimentos com uma base açucarada ou aromatizada (Figura 9) não demonstraram ser benéficos para a deteção de LAB, assim como no caso dos alimentos com matéria gorda mais elevada (Figura 10). Considerando as variáveis composição e teor de gordura, as diferenças encontradas não apresentaram significância estatística ($p = 0,081$, ou seja, $p > 0,05$ e $p = 0,224$, ou seja, $p > 0,05$, respetivamente). No caso da matriz alimentar (Figura 11) as diferenças entre as matrizes transportadoras de probióticos, uma matriz de leite de vaca e uma matriz de bebida de soja foram estatisticamente significativas ($p = 0,029$, ou seja, $p < 0,05$).

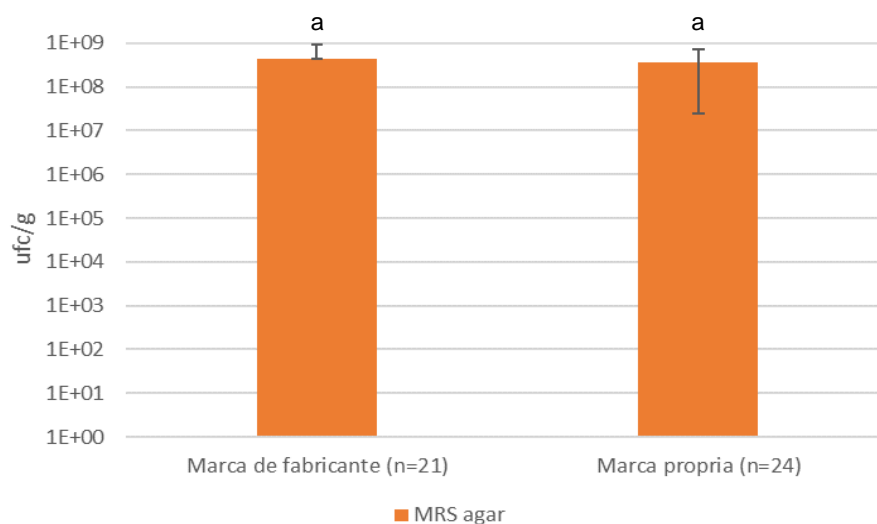


Figura 12. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para as 45 amostras de alimentos fermentados, segundo a marca (marca de fabricante e marca própria). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (a) ($p > 0,05$).

As contagens médias de LAB obtidas para as amostras de marca de fabricante e de marca própria foram da mesma ordem de grandeza, $4,28 \times 10^8$ ufc/g e $3,71 \times 10^8$ ufc/g, respetivamente (Figura 12), não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,937$, ou seja, $p > 0,05$). Contudo o desvio padrão obtido com os resultados dos alimentos de marca própria foi maior, demonstrando assim a heterogeneidade das contagens obtidas.

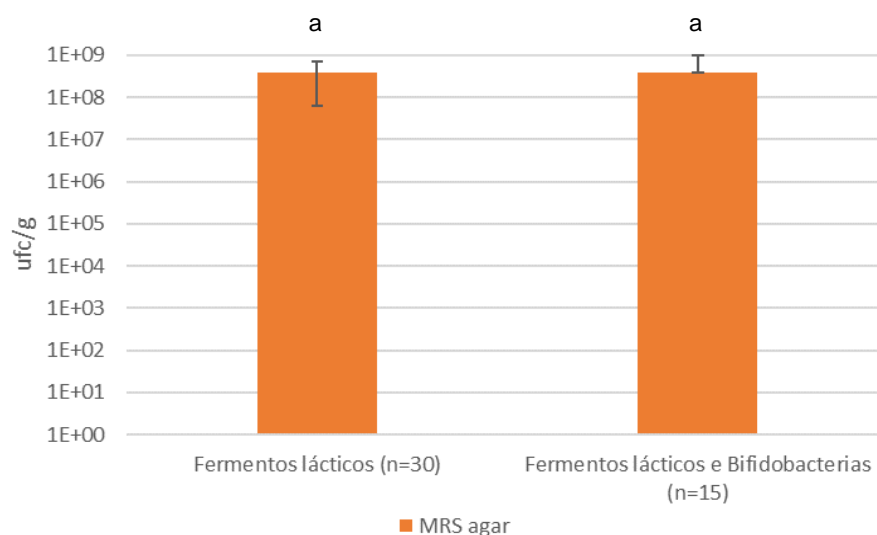


Figura 13. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para as 45 amostras de alimentos fermentados, segundo o uso de suplementação (fermentos lácticos e fermentos lácticos e bifidobactérias). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (a) ($p > 0,05$).

Os alimentos suplementados com bifidobactérias (Figura 13) apresentaram valores de contagens de LAB ligeiramente superiores ($4,0 \times 10^8$), quando comparado com os alimentos que referem apenas a presença de fermentos lácticos ($3,97 \times 10^8$). Ainda assim estes valores encontram-se dentro da mesma ordem de grandeza (10^8) e as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p = 0,289$, ou seja, $p > 0,05$).

4.3 Sobrevivência de bactérias do ácido-láctico (LAB) ao processo de digestão *in vitro*

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos das contagens de LAB (ufc/g) antes e após o processo de simulação da digestão humana *in vitro*. Todas as amostras apresentam contagens iniciais semelhantes, contudo após a simulação da digestão *in vitro* existe uma redução dos valores de LAB, sendo que esta diferença é estatisticamente significativa ($p < 0.001$).

Os microrganismos presentes nas amostras de iogurte padrão (A e B) revelaram uma sensibilidade diferente ao processo de digestão, ou seja, apesar de ser expectável que estas amostras apresentem as mesmas espécies de culturas *starter* por forma a cumprirem a legislação, segundo a Portaria nº 742/92 (Anónimo, 1992), estas presumivelmente variam na quantidade em que cada estirpe é utilizada. As amostras de iogurte bífidos (C e D) apresentam resultados semelhantes e comparáveis com a amostra E, que apesar de esta ser uma alternativa vegetal ao iogurte é igualmente suplementada com bifidobactérias. A amostra F, referente a um iogurte skyr, é a amostra que apresenta um teor de gordura mais baixo, e também um dos valores de contagens de LAB após a digestão mais baixos.

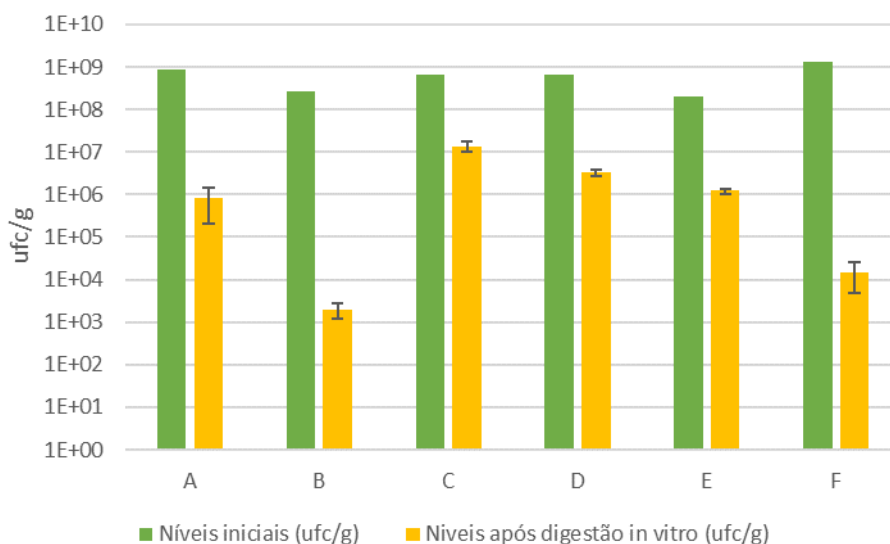


Figura 14. Sobrevivência de bactérias LAB presente em seis produtos fermentados diferentes. Os valores de contagem após simulação da digestão *in vitro* evidenciaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.001$).

Por forma a avaliar se as diferenças entre a formulação de cada amostra afetaram os resultados de contagem após a simulação da digestão, efetuaram-se vários testes

estatísticos. Comparando o tipo, sólido versus batido, apesar da diferença verificada no número de LAB, $3,85 \times 10^6$ e $1,51 \times 10^4$ (Figura 15), esta não é estatisticamente significativa ($p = 130$, ou seja, $p > 0,05$). Por outro lado, o teor de gordura mostrou ser um dos parâmetros com diferença estatisticamente significativas ($p = 0,027$, ou seja, $p < 0,05$) (Figura 16).

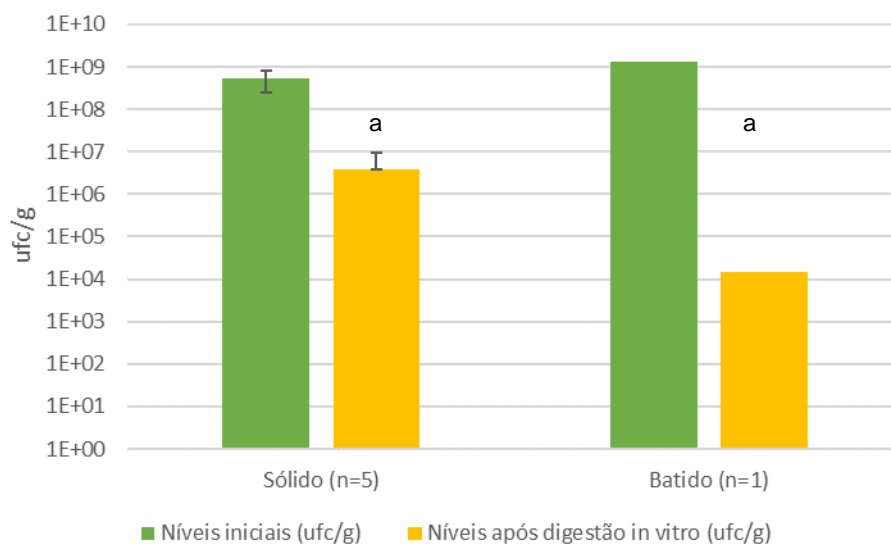


Figura 15. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para 6 produtos fermentados diferentes, segundo o tipo (sólido e batido). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (a) ($p > 0,05$).

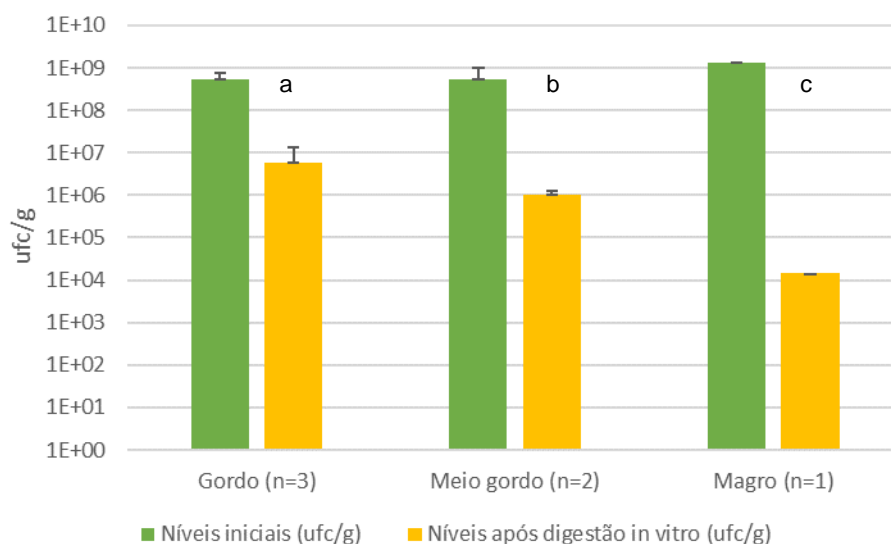


Figura 16. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para 6 produtos fermentados diferentes, segundo o teor de gordura (gordo, meio gordo e magro). Letras (a, b e c) apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A matriz alimentar (Figura 17) e a marca (Figura 18) não mostraram exercer diferença estatisticamente significativas, $p = 0,912$, ou seja, $p > 0,05$, e $p = 0,536$, ou seja, $p > 0,05$, respetivamente.

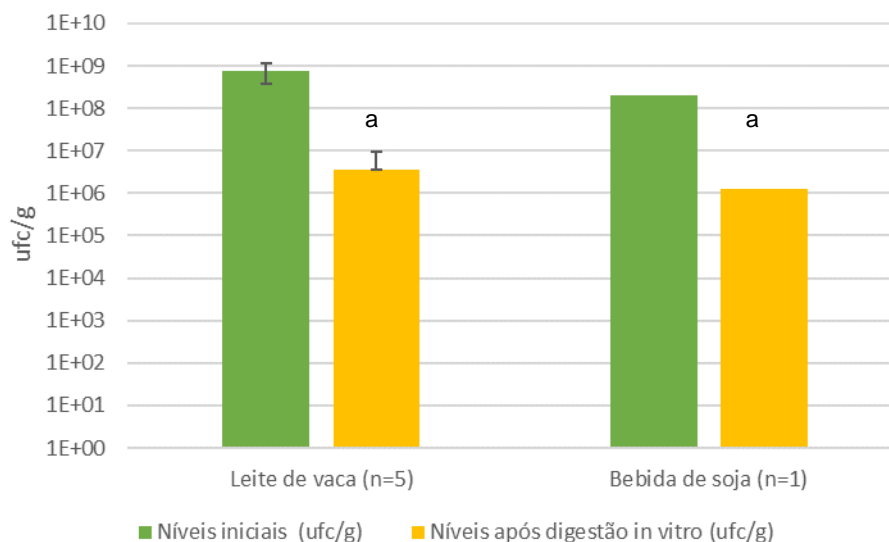


Figura 17. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para 6 produtos fermentados diferentes, segundo a matriz alimentar (leite de vaca e bebida de soja). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (a) ($p > 0,05$).

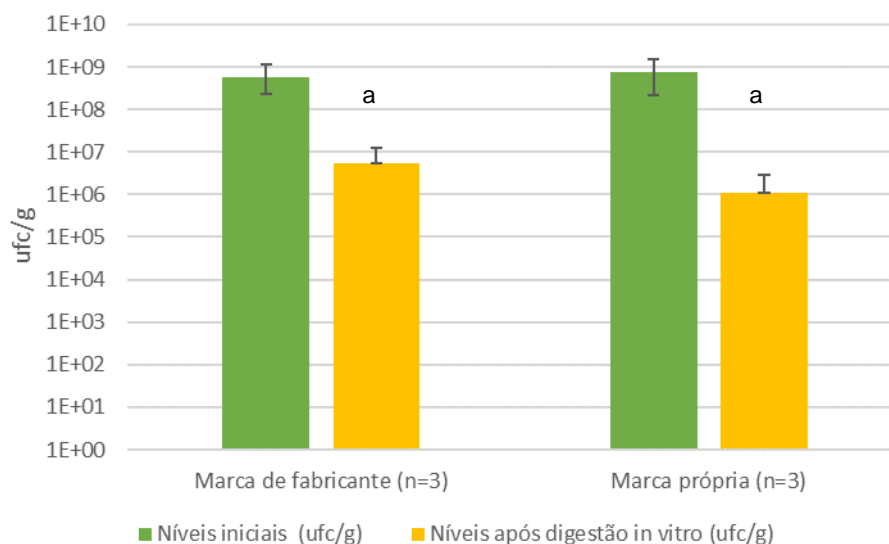


Figura 18. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para 6 produtos fermentados diferentes, segundo a marca (marca de fabricante e marca própria). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas (a) ($p > 0,05$).

Por fim verificou-se que a suplementação (Figura 19) confere diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,00$, ou seja, $p < 0,05$). Assim, tendo em conta os dados do presente trabalho, é possível constatar que apenas o teor de gordura e a

suplementação afetaram significativamente a sobrevivência de LAB à simulação do processo de digestão humana *in vitro*.

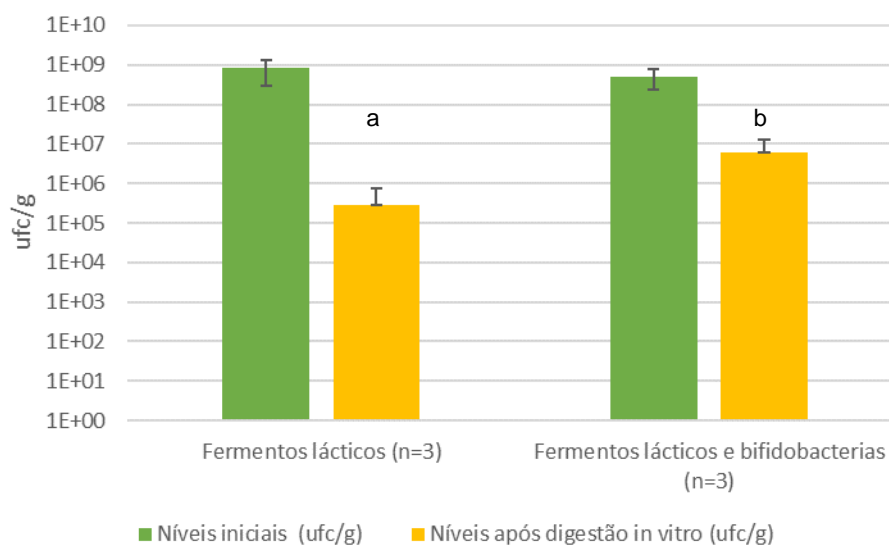


Figura 19. Valor médio (e respetivo desvio padrão) dos resultados obtidos para 6 produtos fermentados diferentes, segundo suplementação (fermentos lácticos e fermentos lácticos e bifidobactérias). Letras (a e b) apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.4 Identificação de espécies bacterianas em alimentos fermentados

Para as amostras consideradas nos ensaios de digestão *in vitro* foi também efetuada a identificação das espécies bacterianas presentes nesses alimentos. A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos através do sistema automatizado VITEK® MS.

Tabela 12. Espécies bacterianas presentes em seis amostras de alimentos fermentados (A, B, C, D, E e F), identificadas através de VITEK® MS, utilizando a técnica MALDI-TOF MS.

Amostra	Valor de confiança (%)	Microrganismo
A	99,9	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	33,3	<i>Streptococcus salivarius ssp thermophilus</i>
B	99,9	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	33,3	<i>Streptococcus salivarius ssp thermophilus</i>
C	99,9	<i>Bifidobacterium animalis</i>
D	99,9	<i>Bifidobacterium animalis</i>
E	99,9	<i>Bifidobacterium animalis</i>
F	33,3	<i>Streptococcus salivarius ssp thermophilus</i>

Nas placas de *Petri* inoculadas com as amostras A e B foi possível distinguir macroscopicamente dois tipos de colónias bem definidas, sendo que as que estavam presentes em maior número e com maior dimensão correspondiam à espécie *Lactobacillus delbrueckii*, e apesar do sistema não fazer a identificação até ao nível da

subespécie, é expectável que pertençam a *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*; as restantes colónias, mais pequenas, correspondiam à espécie *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus*. No caso da amostra F os resultados não foram conclusivos e obtiveram-se várias espécies possíveis com valores de confiança baixos, podendo ser justificado pelo facto desta metodologia estar mais direccionada para aplicações clínicas/identificação de isolados de amostras biológicas. Da lista de espécies obtidas a que apresentou um perfil mais credível, ou seja, aquela que naturalmente estaria presente num alimento fermentado, seria a espécie *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus*. Posteriormente, por meio do sistema automatizado VITEK® 2, veio a confirmar-se que era esta a espécie presente com 86% de probabilidade.

5. Discussão de resultados

A demanda dos consumidores pelo consumo de alimentos funcionais tem incentivado a indústria a disponibilizar no mercado cada vez mais alimentos com elementos de valor acrescentado, como por exemplo probióticos. Todavia, são também conhecidos alguns inconvenientes para os quais devem ser encontradas soluções adequadas e que sirvam os requisitos de todos os intervenientes, desde a indústria ao consumidor. Alguns possíveis exemplos são: assegurar a sobrevivência de culturas probióticas durante e após o processo de fabrico, assim como, após a ingestão pelo consumidor e durante a digestão; melhorar as características nutricionais do alimento de acordo com o tipo de exigência do consumidor sem comprometer as particularidades originais do mesmo; e fornecer uma informação correta das características e benefícios decorrentes do consumo de tal alimento após a sua ingestão (Tripathi & Giri, 2014).

A viabilidade de microrganismos probióticos não está apenas dependente da sua capacidade de sobrevivência às condições encontradas no trato gastrointestinal, mas também está dependente das condições de produção, processamento e armazenamento (Tripathi & Giri, 2014). A matriz alimentar utilizada para a produção de alimentos que integrem probióticos desempenha um papel central na adaptação destes microrganismos às condições gastrointestinais (Matias, Padilha, Bedani, & Saad, 2016), e depende de vários parâmetros, tais como: pH, oxigénio, atividade da água, presença de sal, açúcar e produtos químicos como o peróxido de hidrogénio, bacteriocinas, aromas artificiais e corantes (Tripathi & Giri, 2014). O baixo pH encontrado em iogurtes é um dos fatores limitantes à incorporação de culturas probióticas nestes produtos. A maioria das culturas probióticas tem um pH ótimo de crescimento entre 5 e 9, e conseqüentemente: o pH do produto deve ser mantido num valor superior a 4,6, devendo ser selecionadas estirpes probióticas mais resistentes à acidez do meio e/ou reduzir a concentração de *Lactobacillus bulgaricus* na cultura inicial, a fim de se reduzir as alterações pós-acidificação do produto pronto a consumir (Granato, Nazzaro, Pimentel, Esmerino, & Gomes da Cruz, 2019). Na presença de oxigénio, certas culturas, particularmente *Lactobacillus delbrueckii*, libertam peróxido de hidrogénio no meio tornando-o mais ácido, o que conseqüentemente conduz à inibição de bifidobactérias (Champagne, Gardner, & Roy, 2005).

Ao nível do processamento, segundo Tripathi & Giri (2014), os parâmetros que afetam a sobrevivência dos probióticos são o tratamento térmico, a temperatura de

incubação, a taxa de arrefecimento do produto, os materiais da embalagem, os métodos de armazenamento e a escala de produção (Tripathi & Giri, 2014). Ao nível do armazenamento, a composição de estirpes probióticas utilizadas e a quantidade e proporção da inoculação desencadeiam taxas de sobrevivência diferentes (Tripathi & Giri, 2014).

A seleção de culturas probióticas utilizadas na produção de alimentos funcionais, em particular os produtos lácteos fermentados, que são o grupo de alimentos mais consumido para a aquisição de probióticos (Corona et al., 2016), deve ter em conta os níveis de concentração de microrganismos. Assim, para que estes microrganismos possam proporcionar benefícios para a saúde do hospedeiro são necessários níveis superiores a 10^{10} ufc/g de cada espécie, para o caso de culturas com varias espécies (Mattila-Sandholm et al., 2002), e 10^9 ufc/g no produto final (Panghal et al., 2018), não sendo especificado se se trata de monoculturas ou culturas mistas. Vários autores têm sugerido que os alimentos com probióticos devem apresentar entre 10^6 e 10^{10} ufc/g (Allgeyer, Miller, & Lee, 2010; Bosnea, Kopsahelis, Kokkali, Terpou, & Kanellaki, 2017; Mondragón-Bernal, Alves, Teixeira, Ferreira, & Maugeri Filho, 2017; Mousavi, Heshmati, Garmakhany, Vahidinia, & Taheri, 2019; Sanders, M. E. & in't Veld H., 1999; Shori, 2016) e que estes níveis devem permanecer inalterados durante o tempo de vida útil do produto. A baixa taxa de sobrevivência de culturas probióticas no leite tem sido contornada pela indústria através da adição de componentes que não sejam hidrolisados ou absorvidos no estômago ou no intestino delgado (Bosnea et al., 2017), os designados prebióticos (extratos de plantas, proteínas do leite, entre outros) a fim de aumentar a sobrevivência desses microrganismos nos produtos bem como durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano (Granato et al., 2019).

O processo de digestão dos alimentos poderá alterar os níveis de probióticos presentes inicialmente nos alimentos e assim afetar a eficácia dos potenciais benefícios destes microrganismos no ser humano. O presente estudo pretendeu quantificar o número de bactérias LAB presentes em alimentos fermentados disponíveis em Portugal durante o seu tempo de vida útil, bem como, avaliar a sua capacidade de sobrevivência utilizando um modelo estático de digestão humana *in vitro*. Avaliaram-se os níveis microbiológicos obtidos através de dois métodos de quantificação de LAB: um método normalizado de contagem em placa (MRS agar) e um método alternativo, utilizando um sistema automatizado (TEMPO® LAB). As espécies bacterianas presentes em alguns dos alimentos fermentados considerados foram ainda identificadas através do sistema VITEK® MS.

5.1 Comparação do método de contagem em placa (MRS agar) com o método alternativo (TEMPO® LAB)

Neste estudo foi comparado o desempenho de dois métodos de contagem de bactérias do ácido-láctico (LAB), o método de cultura clássico MRS agar e o método automatizado TEMPO® LAB. Apesar do sistema TEMPO® LAB não ser concebido especificamente para a quantificação de bactérias LAB em produtos lácteos (Anónimo, 2018), procedeu-se à comparação destas duas metodologias por forma a avaliar a potencial utilização do sistema TEMPO® LAB atendendo a que é um método automatizado e por conseguinte apresentando maior celeridade do processo de análise. Visto que o meio MRS agar assegura um crescimento exuberante de lactobacilos, tanto

em amostras biológicas (esfregaços orais e fezes), como alimentares (ex. lácteas) assim como de outras fontes, era esperado obterem-se contagens superiores com este procedimento quando comparado com a metodologia TEMPO® LAB. De acordo com o suporte técnico da empresa que comercializa o sistema TEMPO® LAB, esta metodologia não deve ser usada para a contagem de culturas termófilas iniciadoras ou *starters*, pois é altamente provável que os resultados sejam subestimados (Anónimo, 2018). O método que inclui o meio MRS agar é o mais utilizado e considerado o método padrão de contagem em placa, de *Lactobacillus*, embora *Bifidobacterium* spp. também possam crescer (Shafiei, 2018; Zielińska, Oldak, Rzepkowska, & Zieliński, 2018). Este meio é considerado um meio não seletivo (Ashraf & Shah, 2011), contudo com ligeiras alterações na sua formulação e/ou temperatura de incubação também pode funcionar como meio diferencial ou seletivo, permitindo distinguir LAB de outras bactérias probióticas (Ashraf & Shah, 2011).

Ainda assim, esperava-se que os resultados do TEMPO® LAB fossem da mesma ordem de grandeza para a mesma categoria de produto (ou seja iogurte padrão, iogurte bífidos, iogurte grego, iogurte skyr, kefir e alternativa vegetal ao iogurte), o que não se verificou. A exceção foram os alimentos fermentados do tipo líquido, em que os resultados obtidos entre os dois métodos foram mais coerentes. No caso das amostras de kefir, que são do tipo líquido, apesar de este ser uma associação entre bactérias e leveduras numa matriz polissacarídea, os resultados obtidos com os dois métodos aplicados foram concordantes, o que permite concluir que estes métodos não são afetados pela presença de outros microrganismos, eventualmente presentes na amostra. Esta hipótese pode ser sustentada segundo as publicações de Kesmen e Kacmaz (2011) e Zanirati et al. (2015) onde referem que as bactérias LAB são dominantes nos grãos de kefir sendo que as espécies de *Lactobacillus* correspondem a 80-90% da contagem microbiana total (Kesmen & Kacmaz, 2011; Zanirati et al., 2015). Contudo as contagens do número de lactobacilos a partir dos grãos de kefir, em MRS agar, foram ligeiramente mais baixas do que o descrito na literatura ($1,64 \times 10^7$ ufc/g), onde estes valores variam geralmente entre 10^8 a 10^9 ufc/g (Garofalo et al., 2015). Apesar de este valor ser mais baixo, não significa necessariamente que o kefir não possa exercer efeito probiótico uma vez que as bactérias LAB estabelecem relações com outros microrganismos com potencial de probiótico. Com o método de contagem em meio MRS agar, verificou-se que para a maioria das categorias de alimentos (iogurte padrão, iogurte bífidos, iogurte grego, kefir e alternativa vegetal ao iogurte) as contagens de microrganismos obtidas estão dentro do intervalo de valores recomendados, entre 10^6 - 10^{10} ufc/g, como referido anteriormente. Apenas o iogurte skyr apresenta contagens ligeiramente mais baixas (10^5 ufc/g). Tendo em consideração que as diferenças no tipo, isto é, a forma de apresentação dos produtos, reflete as suas características em termos de composição e processamento tecnológico, estas poderão justificar as diferenças encontradas nos resultados deste estudo. Contudo, estudos futuros deverão contribuir para o esclarecimento desta hipótese.

Podemos concluir que o método TEMPO® LAB não apresentou um desempenho satisfatório na quantificação de bactérias LAB nos alimentos ensaiados. As contagens obtidas com o método de contagem em meio MRS agar foram mais elevadas, e sendo este o método considerado padrão, é possível concluir que o método utilizando o sistema TEMPO® LAB não quantificou a totalidade das bactérias que estavam presentes no

alimento. Assim, o presente estudo reforça que o método de contagem em meio MRS agar constitui o método preferencial para a quantificação de LAB.

Pelas razões apresentadas anteriormente, o método de quantificação selecionado para avaliar a sobrevivência de LAB, antes e após a simulação do processo de digestão humana *in vitro*, foi o de contagem em meio MRS agar.

5.2 Caracterização microbiológica dos diferentes alimentos fermentados

No presente estudo, verificou-se que em relação ao tipo, as diferenças foram estatisticamente significativas entre líquido e batido e entre líquido e sólido, mas não entre sólido e batido, não sendo possível alcançar uma justificação para tal diferença.

Em relação à composição, os alimentos fermentados de aroma apresentaram contagens mais baixas quando comparados com os resultados das amostras naturais ou açucarados. Como é mencionado por Champagne et al. (2005) e Sanders M. E. & in't Veld, H., (1999), os iogurtes aromatizados com fruta diminuem a estabilidade e o crescimento de probióticos, e em particular de bifidobactérias, (Champagne et al., 2005; Sanders, M. E. & in't Veld, H., 1999), contudo esta relação não é linear, e é dependente da estirpe utilizada (Bedani et al., 2014). Apesar de no presente estudo se ter verificado que as amostras com aroma apresentaram menor contagem de LAB que as amostras naturais, estas diferenças não demonstraram ser estatisticamente significativas. Tal facto poderá estar relacionado com a heterogeneidade de amostras que podem ser consideradas e as suas características intrínsecas. Ou seja, o grupo "aroma" pode incluir uma grande variedade de produtos que poderão apresentar diferentes características e que por isso podem apresentar diferentes contagens (Champagne et al., 2005).

Ao nível da matéria gorda não se observaram diferenças estatisticamente significativas. Revela-se assim que a matéria gorda não influencia significativamente a sobrevivência das bactérias, tal como referido por Champagne et al. (2005) e Sanders & Veld (1999) (Champagne et al., 2005; Mary Ellen Sanders & Huis in't Veld, 1999). Todavia a formulação de iogurtes com baixo teor de gordura, apresenta algumas dificuldades de produção, tais como: a separação do soro do leite (sinérese) e apresentarem uma textura frágil (Prasanna, Grandison, & Charalampopoulos, 2013). Em regra, este facto resulta na necessidade de adicionar agentes estabilizadores ou de aumentar o nível de sólidos do leite, não comprometendo o perfil sensorial do produto final. Deste modo, o uso *in situ* de bactérias LAB produtoras de exopolissacarídeos (EPSs), nomeadamente *Lactobacilli*, *Lactococci*, *Streptococci*, e *Bifidobacterium*, apresentam uma alternativa viável aos estabilizadores adicionados que para além de melhorarem as propriedades físico-químicas do iogurte também exercem atividade probiótica (Prasanna et al., 2013). Outra estratégia utilizada para reduzir a sinérese, em iogurtes probióticos, é enriquecer a matriz alimentar láctea com prebióticos; assim este tipo de matriz passa a proteger as bactérias do ambiente ácido dos iogurtes, com a finalidade de aumentar a viabilidade das culturas probióticas (Bosnea et al., 2017).

Apesar das diferenças verificadas na contagem de LAB entre os alimentos cuja matriz alimentar foi leite de vaca comparando com os alimentos cuja matriz alimentar foi bebida de soja, não é espectável que esta diferença seja devida ao tipo de matriz. Estudos anteriores confirmam que microrganismos probióticos, nomeadamente *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. *acidophilus*, que são as espécies bacterianas mais comuns consideradas como potenciais probióticos, têm a capacidade de

metabolizar oligossacarídeos durante a fermentação da bebida de soja, sendo esta um bom transportador de microrganismos probióticos (Bedani et al., 2013; Farnworth et al., 2007).

No caso da suplementação (com bifidobactérias), a distinção entre alimentos compostos apenas por fermentos lácticos ou compostos por fermentos lácticos e bifidobactérias os valores apresentados são da mesma ordem de grandeza, 10^8 ufc/g, não existindo diferenças estatisticamente significativas. Assim, verifica-se que ao nível do número de LAB estes alimentos não são diferentes (estatisticamente) podendo supor-se que o facto de serem suplementados com bifidobactérias não altera o número total de LAB e ainda que, no caso dos produtos suplementados, o processo de fabrico considera uma mistura de ambos os grupos de bactérias numa proporção que atinja os teores comparáveis com os produtos que apenas apresentam fermentos lácticos.

As diferenças observadas entre alimentos de marca de fabricante e alimentos de marca própria também não apresentam diferenças estatisticamente significativas, revelando que as LAB estão presentes em ambos os alimentos em níveis semelhantes. No entanto, deve realçar-se que as culturas *starter* utilizadas em ambos os grupos poderão ser diferentes, podendo influenciar a capacidade dos probióticos suportarem as diferentes condições físico-químicas ao longo do trato gastrointestinal durante a digestão (Schillinger, Guigas, & Heinrich Holzapfel, 2005). No caso de Portugal, desde 1995, segundo a Portaria nº521/95 de 31 de Maio (Anónimo, 1995), que deixa de ser obrigatório declarar, no rótulo do alimento, o teor de microrganismos específicos presentes no alimento. Por conseguinte, cada marca pode utilizar concentrações variáveis das várias estirpes de LAB, que em consequência vão conferir diferentes características ao produto ou capacidade de resistirem às condições verificadas durante a digestão.

5.3 Sobrevivência de bactérias do ácido-láctico (LAB) ao processo de digestão *in vitro*

Através da simulação do processo de digestão humana *in vitro*, verificou-se que o número de bactérias LAB após a digestão é inferior à quantidade determinada antes da digestão. Uma vez que não está estipulada a quantidade exata de microrganismos que têm de permanecer viáveis no trato gastrointestinal para que possam exercer os seus efeitos benéficos, estima-se apenas a quantidade a ser consumida para que esses efeitos sejam obtidos, baseando-se em doses consideradas eficazes através de estudos em humanos (Williams, 2010). Assim a relação que se pode estabelecer baseia-se no limite mínimo recomendado de ufc/g que deve estar presente no alimento no momento em que este será consumido, isto é 10^6 ufc/g (Ashraf & Shah, 2011; Tripathi & Giri, 2014). Tendo isto em consideração, apenas as amostras C, D e E apresentam valores ($1,39 \times 10^7$, $3,26 \times 10^6$ e $1,23 \times 10^6$ ufc/g, respetivamente) acima deste limite mínimo recomendado. Apesar de C e D terem uma matriz de leite de vaca e E uma matriz de bebida de soja, ambos são suplementados com bifidobactérias o que vem corroborar a capacidade destas bactérias não só resistirem às diferentes condições ao longo do trato gastrointestinal, como de se multiplicarem e a preferência em serem utilizadas como probióticos (Fazilah et al., 2018; Gupta & Garge, 2009; M. E. Sanders et al., 2018). Os resultados obtidos sugerem que a bebida de soja possa ser um bom substrato com vista à proteção das bactérias probióticas durante a digestão, apresentando resultados

comparáveis aos obtidos quando a matriz é leite de vaca. Assim, a utilização de bebida de soja para a produção destes alimentos fermentados pode constituir uma mais valia para os consumidores que pretendam consumir alimentos que não sejam de origem animal ou por restrições alimentares motivadas por condições de saúde, como a intolerância à lactose (Granato et al., 2019).

É sabido que a composição da matriz alimentar influencia a capacidade de sobrevivência dos probióticos ao longo da passagem pelo trato gastrointestinal (Schillinger et al., 2005). Iogurtes que apresentem uma matriz alimentar com elevado conteúdo de proteína ou de gordura proporcionam, em regra, um meio mais adequado para a sobrevivência de microrganismos probióticos atendendo a que proporcionam um ambiente tampão, evitando oscilações bruscas do pH do meio (Schillinger et al., 2005; Shafiei, 2018). Atualmente verifica-se uma tendência de consumo de alimentos fermentados que apresentem menor teor de gordura, como é o caso dos iogurtes skyr. No caso do iogurte skyr, utilizado no presente ensaio (F), houve uma diminuição do número de LAB após o processo de digestão *in vitro* de $1,35 \times 10^9$ ufc/g para $1,51 \times 10^4$ ufc/g. Esta diferença poderá ser justificada pelo baixo teor de gordura que este produto apresenta. Foram observadas também diferenças estatisticamente significativas entre os alimentos com diferentes teores de gordura. Por outro lado, a amostra B, correspondendo a um iogurte padrão, cujo teor de gordura era elevado (gordo) apresentou uma baixa sobrevivência de LAB após a digestão. Assim é difícil estabelecer de forma clara uma tendência no que concerne ao teor de gordura nos alimentos fermentados e a sobrevivência de bactérias probióticas durante a digestão. Estudos futuros considerando outras variáveis e uma maior amostragem deverão contribuir para o esclarecimento desta questão e obter conclusões mais robustas.

De acordo com a legislação em vigor em Portugal, no caso do processo de fabrico do iogurte, independentemente de possíveis variações na formulação que possa sofrer, as bactérias *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* têm de ser as espécies dominantes (Portaria nº 742/92 de 24 de Julho). Assim sendo, era expectável que os diferentes iogurtes padrão considerados no presente estudo apresentassem um comportamento semelhante. Contudo, esta premissa não foi verificada através dos resultados obtidos. As duas amostras referentes ao iogurte padrão (A e B) apresentaram contagens de LAB após o processo de digestão *in vitro* significativamente diferentes, sendo que a amostra A apresentou uma redução de $8,70 \times 10^8$ ufc/g para $8,45 \times 10^5$ ufc/g e a amostra B apresentou uma redução de $2,70 \times 10^8$ ufc/g para $1,95 \times 10^3$ ufc/g. Estas amostras correspondem a alimentos fermentados de marca de fabricante (A) e de marca própria (B). Também no caso do iogurte de bífidos as diferenças entre a amostra de marca de fabricante (C) e a amostra de marca própria (D), apresentaram reduções no número de contagens de LAB, no caso da amostra C passou de $6,70 \times 10^8$ ufc/g para $1,39 \times 10^7$ ufc/g, e no caso da amostra D passou de $6,80 \times 10^8$ ufc/g para $3,26 \times 10^6$ ufc/g. As razões que justifiquem estes resultados são desconhecidas. Contudo, diferenças ao nível das condições de manutenção das estirpes ou mesmo das variedades utilizadas poderão justificar estes resultados.

É de realçar que o número de células probióticas viáveis que devem chegar ao intestino e que permitam obter os melhores benefícios destes agentes permanecem por estabelecer, bem como as estirpes que melhor resistem a esse processo (Allgeyer et al., 2010; Zielińska et al., 2018). Apesar de em muitas situações os mecanismos de ação dos

probióticos estejam bem caracterizados, existem ainda algumas dúvidas sobre as condições precisas necessárias para que um microrganismo ou uma cultura de microrganismos promovam efeito probiótico ou até serem classificados como probióticos; um conjunto de orientações, referidas no relatório da FAO/WHO (2002), indica a necessidade de caracterizar a estirpe microbiana e de ser feito pelo menos um estudo no grupo de humanos alvo para ser considerado probiótico (Reid, Gadir, & Dhir, 2019).

5.4 Identificação de espécies bacterianas em alimentos fermentados

Com a utilização do sistema VITEK® MS pretendeu-se identificar e confirmar a presença das principais espécies bacterianas usadas no fabrico dos alimentos fermentados incluídos nos ensaios de digestão. Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado para cada uma das amostras tendo em conta a flora característica de cada produto. Para o caso particular dos alimentos publicitados como funcionais, como é o caso dos iogurtes contendo bífidos, tais resultados vieram confirmar que as bifidobactérias estão de facto presentes no alimento. Por outro lado, os resultados obtidos evidenciam que a tecnologia MALDI-TOF MS poder ser utilizada para a classificação e identificação de LAB, tanto isoladas de iogurtes como de outros alimentos probióticos, comprovando a sua eficácia na determinação do perfil molecular até ao nível da subespécie (Russo et al., 2019; Zielińska et al., 2018).

6. Conclusão

Os alimentos fermentados são considerados o principal veículo de aquisição de organismos probióticos, sendo o iogurte o produto mais popular em todo o mundo (Ashraf & Shah, 2011; Burgain et al., 2014). A consciencialização da população para a importância da alimentação com vista à manutenção de uma boa saúde tem tido efeito ao nível da formulação de novos produtos alimentares. O iogurte padrão tem sofrido diversas alterações, como por exemplo a redução do teor de gordura e a adição de estirpes específicas com potencial probiótico. No entanto, é importante não só desenvolver um alimento potencialmente funcional, mas também manter a qualidade sensorial e garantir que o consumidor obtenha os maiores benefícios para a saúde do consumo regular de tais alimentos (Granato et al., 2019). Como resultado, torna-se essencial desenvolver medidas adequadas que garantam a sobrevivência dos microrganismos e avaliar a quantificação de células aptas a exercer efeito probiótico no consumidor (Mondragón-Bernal et al., 2017; Sanders, M. E. & in't Veld, H., 1999).

Com o presente trabalho foi possível destacar a importância da composição do alimento na sobrevivência e viabilidade dos microrganismos com potencial probiótico. As variáveis Tipo e Matriz alimentar foram as que apresentaram maior impacto em termos da sobrevivência de LAB durante o tempo de vida útil do alimento. Contudo, estudos futuros deverão permitir a compreensão do impacto destas variáveis. É ainda possível concluir que o limite mínimo recomendado de microrganismos presentes durante o tempo de vida útil dos alimentos (10^6 ufc/g) está a ser cumprido.

Para a quantificação de bactérias LAB, evidenciou-se que a utilização do sistema automatizado TEMPO® LAB não é o mais apropriado como substituto do método de cultura tradicional em meio MRS agar.

O iogurte, o leite fermentado e as alternativas vegetais ao iogurte são bons veículos de administração de probióticos. Mesmo sujeitos a condições adversas, encontradas ao longo do trato gastrointestinal, sobrevivem a tais condições. Verificou-se também que os alimentos atuam como um ambiente complexo e dinâmico, no qual os seus parâmetros físico-químicos afetam diretamente a sobrevivência dos microrganismos ao longo do trato gastrointestinal, principalmente o teor de gordura e os microrganismos que os compõem. A determinação da concentração de bactérias LAB quantificadas após o processo de digestão humana *in vitro* demonstrou que existe uma redução do número de bactérias, contudo ainda permanecem em número significativo para que seja expectável que exerçam efeito probiótico, tendo em conta o valor mínimo recomendado no produto pronto a consumir (10^6 ufc/g). De realçar que a relação entre quantidade, mecanismos de ação e a prevenção de doença ainda não está completamente estabelecida (Sanders et al., 2018). Verificou-se também que as bifidobactérias são aparentemente resilientes ao processo de digestão, e que é justificável o seu uso como potenciais probióticos.

O uso do método MALDI-TOF MS demonstrou ser uma ferramenta rápida e simples para a identificação de LAB. Este poderá assim ser aplicado como método complementar para a identificação de LAB em alimentos lácteos fermentados.

7. Perspetivas futuras

A utilização de sistemas automatizados é cada vez mais um objetivo em microbiologia de alimentos, por forma a agilizar os processos, habitualmente morosos, considerados na microbiologia alimentar clássica. No que concerne à quantificação de bactérias LAB, estudos futuros deveriam considerar o aperfeiçoamento do sistema automatizado TEMPO® LAB para a quantificação de bactérias LAB em alimentos fermentados.

A digestão de alimentos é um processo complexo que tem recebido cada vez mais atenção por parte da indústria alimentar. A análise da sobrevivência de probióticos ao processo de digestão humana está dependente de múltiplos fatores, pois trata-se de diferentes tipos de interações entre diferentes componentes dos alimentos, que são a matriz de transporte destes microrganismos com efeitos benéficos para a saúde. Considerando os resultados obtidos no presente estudo, investigação futura deverá contribuir para o esclarecimento da relação que o teor de gordura e a suplementação, têm na sobrevivência de estirpes bacterianas com potencial probiótico ao processo de digestão humana.

Por último, e atendendo à crescente importância da modulação do microbioma humano recorrendo a intervenções dietéticas, a utilização de alimentos fermentados, nomeadamente iogurtes e produtos similares deverá ser reforçado, com especial ênfase enquanto terapêutica ou prevenção em determinadas doenças. Com o completo entendimento da interação entre os constituintes do alimento e entre os microrganismos,

poderiam ser formulados produtos que fossem ao encontro das necessidades de cada consumidor, não só do ponto de vista terapêutico, direcionado individualmente, como também para quem procura alternativas que concordam com um estilo de vida saudável e consciente sobre os efeitos na saúde dos alimentos que consomem.

8. Bibliografia

- Allgeyer, L. C., Miller, M. J., & Lee, S.-Y. (2010). Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4471–4479. <https://doi.org/10.3168/JDS.2009-2582>
- Amerongen, H. M. (2018). Anatomy and Histology of the Digestive Tract. In *Comprehensive Toxicology* (pp. 3–15). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02118-8>
- Arena, M., Caggianiello, G., Russo, P., Albenzio, M., Massa, S., Fiocco, D., ... Spano, G. (2015). Functional Starters for Functional Yogurt. *Foods*, 4(4), 15–33. <https://doi.org/10.3390/foods4010015>
- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2011). Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt — A review. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 194–208. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2011.07.008>
- Bedani, R., Rossi, E. A., & Isay Saad, S. M. (2013). Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 34(2), 382–389. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2013.01.012>
- Bedani, R., Vieira, A. D. S., Rossi, E. A., & Saad, S. M. I. (2014). Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 436–443. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2013.10.015>
- Bornhorst, G. M., Gouseti, O., Wickham, M. S. J., & Bakalis, S. (2016). Engineering Digestion: Multiscale Processes of Food Digestion. *Journal of Food Science*, 81(3), R534–R543. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13216>
- Bosnea, L. A., Kopsahelis, N., Kokkali, V., Terpou, A., & Kanellaki, M. (2017). Production of a novel probiotic yogurt by incorporation of *L. casei* enriched fresh apple pieces, dried raisins and wheat grains. *Food and Bioprocess Processing*, 102, 62–71. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2016.11.010>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

- Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A. M., ... Gaiani, C. (2014). Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 213, 21–35. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2014.09.005>
- Calabuig-Jiménez, L., Betoret, E., Betoret, N., Patrignani, F., Barrera, C., Seguí, L., ... Dalla Rosa, M. (2019). High pressures homogenization (HPH) to microencapsulate *L. salivarius* spp. *salivarius* in mandarin juice. Probiotic survival and in vitro digestion. *Journal of Food Engineering*, 240, 43–48. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2018.07.012>
- Carlson, B. M. (2019). The Digestive System. *The Human Body*, 321–355. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804254-0.00012-0>
- Champagne, C. P., Gardner, N. J., & Roy, D. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(1), 61–84. <https://doi.org/10.1080/10408690590900144>
- Chen, C., Zhao, S., Hao, G., Yu, H., Tian, H., & Zhao, G. (2017). Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S316–S330. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1295988>
- Corona, O., Randazzo, W., Miceli, A., Guarcello, R., Francesca, N., Erten, H., ... Settanni, L. (2016). Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 572–581. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.11.014>
- Crichton, G. E., & Alkerwi, A. (2014). Whole-fat dairy food intake is inversely associated with obesity prevalence: findings from the Observation of Cardiovascular Risk Factors in Luxembourg study. *Nutrition Research*, 34(11), 936–943. <https://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2014.07.014>
- Danneskiold-Samsøe, N. B., Dias de Freitas Queiroz Barros, H., Santos, R., Bicas, J. L., Cazarin, C. B. B., Madsen, L., ... Maróstica Júnior, M. R. (2019). Interplay between food and gut microbiota in health and disease. *Food Research International*, 115, 23–31. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.07.043>
- de Oliveira, S. C., Bourlieu, C., Ménard, O., Bellanger, A., Henry, G., Rousseau, F., ... Deglaire, A. (2016). Impact of pasteurization of human milk on preterm newborn in vitro digestion: Gastrointestinal disintegration, lipolysis and proteolysis. *Food Chemistry*, 211, 171–179. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.05.028>
- de Oliveira, S. C., Deglaire, A., Ménard, O., Bellanger, A., Rousseau, F., Henry, G., ... Bourlieu, C. (2016). Holder pasteurization impacts the proteolysis, lipolysis and disintegration of human milk under in vitro dynamic term newborn digestion. *Food Research International*, 88, 263–275. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.11.022>
- Dertli, E., & Çon, A. H. (2017). Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 151–157. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.07.017>

- Ding, R., Goh, W.-R., Wu, R., Yue, X., Luo, X., Khine, W. W. T., ... Lee, Y.-K. (2019). Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease. *Journal of Food and Drug Analysis*. <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2018.12.012>
- Dupont, D. (2016). In Vitro Digestion Models. *Reference Module in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21091-3>
- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., ... Portmann, R. (2016). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, *88*, 217–225. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.12.006>
- European Food Safety Authority (efsa). (n.d.). Qualified presumption of safety (QPS) | European Food Safety Authority. Retrieved April 19, 2019, from <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps>
- Farnworth, E. R., Mainville, I., Desjardins, M.-P., Gardner, N., Fliss, I., & Champagne, C. (2007). Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *International Journal of Food Microbiology*, *116*(1), 174–181. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2006.12.015>
- Fazilah, N. F., Ariff, A. B., Khayat, M. E., Rios-Solis, L., & Halim, M. (2018). Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. *Journal of Functional Foods*, *48*, 387–399. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.07.039>
- Felice, V. D., & O'Mahony, S. M. (2017). The microbiome and disorders of the central nervous system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *160*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2017.06.016>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Retrieved from https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- Galdeano, C. M., de Moreno de LeBlanc, A., Vinderola, G., Bonet, M. E. B., & Perdigon, G. (2007). Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, *14*(5), 485–492. <https://doi.org/10.1128/CVI.00406-06>
- García, C., Rendueles, M., & Díaz, M. (2019). Liquid-phase food fermentations with microbial consortia involving lactic acid bacteria: A review. *Food Research International*, *119*, 207–220. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.01.043>
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Aquilanti, L., De Filippis, F., Stellato, G., ... Clementi, F. (2015). Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiology*, *49*, 123–133. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2015.01.017>
- Giromini, C., Cheli, F., Rebucci, R., & Baldi, A. (2019). Invited review: Dairy proteins and bioactive peptides: Modeling digestion and the intestinal barrier. *Journal of Dairy Science*, *102*(2), 929–942. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-15163>

- Gobbetti, M., Cagno, R. Di, & De Angelis, M. (2010). Functional Microorganisms for Functional Food Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(8), 716–727. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499770>
- Granato, D., Nazzaro, F., Pimentel, T. C., Esmerino, E. A., & Gomes da Cruz, A. (2019). Probiotic Food Development: An Updated Review Based on Technological Advancement. In *Encyclopedia of Food Security and Sustainability* (pp. 422–428). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22271-3>
- Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., & Morelli, L. (2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition*, 93(06), 783. <https://doi.org/10.1079/BJN20051428>
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591–600. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2012.08.001>
- Guo, Q., Ye, A., Lad, M., Dalgleish, D., & Singh, H. (2014). Effect of gel structure on the gastric digestion of whey protein emulsion gels. *Soft Matter*, 10(8), 1214. <https://doi.org/10.1039/c3sm52758a>
- Gupta, V., & Garge, R. (2009). Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3), 202–210. https://doi.org/IndianJMedMicrobiol_2009_27_3_202_53201 [pii]r10.4103/0255-0857.53201
- Jouvet, N., & Estall, J. L. (2017). The pancreas: Bandmaster of glucose homeostasis. *Experimental Cell Research*, 360(1), 19–23. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2017.03.050>
- Kesmen, Z., & Kacmaz, N. (2011). Determination of Lactic Microflora of Kefir Grains and Kefir Beverage by Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. *Journal of Food Science*, 76(5), M276–M283. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02191.x>
- Kok, C. R., & Hutkins, R. (2018). Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. *Nutrition Reviews*, 76(Supplement_1), 4–15. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy056>
- Lavermicocca, P. (2006). Highlights on new food research. *Digestive and Liver Disease*, 38, S295–S299. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(07\)60014-0](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(07)60014-0)
- Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11(1–2), 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00036-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00036-X)
- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2018). In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, 107(February), 423–436. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.055>

- Luo, Q., Chen, D., Boom, R. M., & Janssen, A. E. M. (2018). Revisiting the enzymatic kinetics of pepsin using isothermal titration calorimetry. *Food Chemistry*, 268, 94–100. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.06.042>
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A., & Mackie, A. (2011). The role of bile salts in digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 36–46. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2010.12.002>
- Mat, D. J. L., Cattenoz, T., Souchon, I., Michon, C., & Le Feunteun, S. (2018). Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: In vitro gastric digestions in static and dynamic pH conditions. *Food Chemistry*, 239, 268–275. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.06.115>
- Matias, N. S., Padilha, M., Bedani, R., & Saad, S. M. I. (2016). In vitro gastrointestinal resistance of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in soy and/or milk-based synbiotic apple ice creams. *International Journal of Food Microbiology*, 234, 83–93. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.06.037>
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 173–182. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00099-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00099-1)
- Meddah, A. T. T., Yazourh, A., Desmet, I., Risbourg, B., Verstraete, W., & Romond, M. B. (2001). The regulatory effects of whey retentate from *Bifidobacteria* fermented milk on the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME). *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1110–1117. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01482.x>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Jorge, I. P. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Function*, 5, 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Miralles, B., del Barrio, R., Cueva, C., Recio, I., & Amigo, L. (2018). Dynamic gastric digestion of a commercial whey protein concentrate†. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 1873–1879. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8668>
- Mishra Pandey, S., & Mishra, H. N. (2015). Optimization of the prebiotic & probiotic concentration and incubation temperature for the preparation of synbiotic soy yoghurt using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 458–467. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.12.003>
- Mitsuoka, T. (1982). Recent Trends in Research on Intestinal Flora. *JBF LECTURE Bifidobacteria Microflora*, 1(1), 3–24. https://doi.org/https://doi.org/10.12938/bifidus1982.1.1_3
- Mondragón-Bernal, O. L., Alves, J. G. L. F., Teixeira, M. A., Ferreira, M. F. P., & Maugeri Filho, F. (2017). Stability and functionality of synbiotic soy food during shelf-life. *Journal of Functional Foods*, 35, 134–145. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.05.021>
- Mousavi, M., Heshmati, A., Garmakhany, A. D., Vahidinia, A., & Taheri, M. (2019).

- Optimization of the viability of *Lactobacillus acidophilus* and physico-chemical, textural and sensorial characteristics of flaxseed-enriched stirred probiotic yogurt by using response surface methodology. *LWT*, 102, 80–88.
<https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.12.023>
- Nabil, S., Gauthier, S. F., Drouin, R., Poubelle, P. E., & Pouliot, Y. (2011). In Vitro Digestion of Proteins and Growth Factors in a Bovine Whey Protein Extract as Determined Using a Computer-Controlled Dynamic Gastrointestinal System (TIM-1). *Food Digestion*, 2(1–3), 13–22. <https://doi.org/10.1007/s13228-011-0010-9>
- Panghal, A., Janghu, S., Virkar, K., Gat, Y., Kumar, V., & Chhikara, N. (2018). Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. *Food Bioscience*, 21, 80–89.
<https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2017.12.003>
- Pirbaglou, M., Katz, J., de Souza, R. J., Stearns, J. C., Motamed, M., & Ritvo, P. (2016). Probiotic supplementation can positively affect anxiety and depressive symptoms: a systematic review of randomized controlled trials. *Nutrition Research*, 36(9), 889–898. <https://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2016.06.009>
- Pogačić, T., Šinko, S., Zamberlin, Š., & Samaržija, D. (2013). Microbiota of kefir grains, 63(1), 3–14.
- Prasanna, P. H. P., Grandison, A. S., & Charalampopoulos, D. (2013). Microbiological, chemical and rheological properties of low fat set yoghurt produced with exopolysaccharide (EPS) producing *Bifidobacterium* strains. *Food Research International*, 51(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.11.016>
- Quigley, E. M. M. (2017). Basic Definitions and Concepts: Organization of the Gut Microbiome. *Gastroenterology Clinics of North America*, 46(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.002>
- Quigley, E. M. M. (2019). Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17 (2)(November), 333–334.
<https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.09.028>
- Reid, G., Gadir, A. A., & Dhir, R. (2019). Probiotics: Reiterating What They Are and What They Are Not. *Frontiers in Microbiology*, 10, 424.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00424>
- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2013). Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 136(1), 206–212.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.07.115>
- Rozin, P. (2007). *Food choice: An introduction. Understanding Consumers of Food Products*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781845692506.1.3>
- Russo, R., Valletta, M., Rega, C., Marasco, R., Muscariello, L., Pedone, P. V., ... Chambery, A. (2019). Reliable identification of lactic acid bacteria by targeted and untargeted high-resolution tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 285, 111–118. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.01.127>

- Salminen, S., Kenifel, W., & Ouwehand, A. C. (2011). Bacteria, Beneficial | Probiotics, Applications in Dairy Products. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 412–419). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00048-0>
- Sánchez-Rivera, L., Ménard, O., Recio, I., & Dupont, D. (2015). Peptide mapping during dynamic gastric digestion of heated and unheated skimmed milk powder. *Food Research International*, *77*, 132–139. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.08.001>
- Sanders, M. E., & Huis in't Veld, J. (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek*, *76*(1/4), 293–315. <https://doi.org/10.1023/A:1002029204834>
- Sanders, M. E., Merenstein, D., Merrifield, C. A., & Hutkins, R. (2018). Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin*, *43*(3), 212–225. <https://doi.org/10.1111/nbu.12334>
- Sarkar, A., Ye, A., & Singh, H. (2016). On the role of bile salts in the digestion of emulsified lipids. *Food Hydrocolloids*, *60*, 77–84. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2016.03.018>
- Saulnier, D. M., Spinler, J. K., Gibson, G. R., & Versalovic, J. (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*, *20*(2), 135–141. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2009.01.002>
- Schillinger, U., Guigas, C., & Heinrich Holzapfel, W. (2005). In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, *15*(12), 1289–1297. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2004.12.008>
- Shafiei, Y. (2018). Probiotic and Synbiotic Yogurt Production Using Free or Alginate / Resistant Starch Microencapsulated Lactobacillus plantarum. In *Role of Materials Science in Food Bioengineering* (pp. 331–328). Islamic Azad University, Khoy, Iran: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811448-3/00009-7>
- Shori, A. B. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, *13*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2015.11.001>
- Thiele, I., Heinken, A., & Fleming, R. M. (2013). A systems biology approach to studying the role of microbes in human health. *Current Opinion in Biotechnology*, *24*(1), 4–12. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2012.10.001>
- Thorning, T. K., Bertram, H. C., Bonjour, J.-P., de Groot, L., Dupont, D., Feeney, E., ... Givens, I. (2017). Whole dairy matrix or single nutrients in assessment of health effects: current evidence and knowledge gaps. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *105*(5), 1033–1045. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.151548>
- Treuting, P. M., Arends, M. J., & Dintzis, S. M. (2018). Upper Gastrointestinal Tract. In *Comparative Anatomy and Histology* (pp. 191–211). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00011-7>

- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225–241. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2014.04.030>
- Ulleberg, E. K., Comi, I., Holm, H., Herud, E. B., Jacobsen, M., & Vegarud, G. E. (2011). Human Gastrointestinal Juices Intended for Use in In Vitro Digestion Models. *Food Digestion*, 2(1–3), 52–61. <https://doi.org/10.1007/s13228-011-0015-4>
- Vaikunthanathan, T., Safinia, N., Lombardi, G., & Lechler, R. I. (2016). Microbiota, immunity and the liver. *Immunology Letters*, 171, 36–49. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2016.01.008>
- Wahyono, L., Pudjono, & Widyati, P. (2010). Uji aktivitas senyawa antiplasmodium dari fungi endofit tanaman *Artemisia annua* L. *Majalah Farmasi Indonesia*, 21(214), 230–235.
- Wickham, M., Faulks, R., & Mills, C. (2009). In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(8), 952–958. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800193>
- Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(6), 449–458. <https://doi.org/10.2146/ajhp090168>
- Zanirati, D. F., Abatemarco, M., Sandes, S. H. de C., Nicoli, J. R., Nunes, Á. C., & Neumann, E. (2015). Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*, 32, 70–76. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2014.12.007>
- Zhang, N., Ju, Z., & Zuo, T. (2018). Time for food: The impact of diet on gut microbiota and human health. *Nutrition*, 51–52, 80–85. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2017.12.005>
- Zhang, Q., Cundiff, J. K., Maria, S. D., McMahon, R. J., Wickham, M. S. J., Faulks, R. M., & van Tol, E. A. F. (2014). Differential Digestion of Human Milk Proteins in a Simulated Stomach Model. *Journal of Proteome Research*, 13(2), 1055–1064. <https://doi.org/10.1021/pr401051u>
- Zielińska, D., Oldak, A., Rzepkowska, A., & Zieliński, K. (2018). Enumeration and Identification of Probiotic Bacteria in Food Matrices. *Advances in Biotechnology for Food Industry*, 14, 167–196. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811443-8.00006-2>
- Zoumpopoulou, G., Pot, B., Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. (2017). Dairy probiotics : Beyond the role of promoting gut and immune health. *International Dairy Journal*, 67, 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.09.010>

Anexos

Anexo 1 – A1. Caracterização das amostras incluídas no plano de amostragem por categoria de produto.

Amostra	Tipo	Composição	Matéria gorda	Matriz alimentar	Marca	Suplementação
logurte Natural						
P1	Sólido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
P2	Sólido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
P3	Sólido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
P4	Sólido	Natural	Meio gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
P5	Sólido	Natural	Magro	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos
P6	Sólido	Natural	Meio gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
P7	Sólido	Açucarado	Meio gordo	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos
P8	Sólido	Natural	Meio gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
P9	Sólido	Natural	Meio gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
P10	Sólido	Natural	Meio gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
P11	Sólido	Natural	Meio gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
P12	Sólido	Natural	Meio gordo	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos
P13	Sólido	Natural	Meio gordo	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos
P14	Sólido	Natural	Meio gordo	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos
P15	Sólido	Natural	Meio gordo	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos
P16	Sólido	Natural	Magro	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos
P17	Sólido	Natural	Meio gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
logurte Bífidos						
B1	Sólido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos e Bifidobactérias
B2	Sólido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos e Bifidobactérias
B3	Sólido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos e Bifidobactérias

B4	Líquido	Aroma	Meio gordo	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos e Bifidobactérias
B5	Líquido	Aroma	Meio gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos e Bifidobactérias
B6	Sólido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos e Bifidobactérias
B7	Sólido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos e Bifidobactérias
B8	Sólido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos e Bifidobactérias
B9	Sólido	Natural	Magro	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos e Bifidobactérias
B10	Sólido	Natural	Magro	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos e Bifidobactérias
B11	Sólido	Açucarado	Meio gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos e Bifidobactérias
logurte Grego						
G1	Batido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos
G2	Batido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos
G3	Batido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
G4	Batido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
G5	Batido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos
G6	Batido	Açucarado	Gordo	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
logurte Skyr						
S1	Batido	Aroma	Magro	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos
S2	Batido	Natural	Magro	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
S3	Batido	Natural	Magro	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
S4	Batido	Natural	Magro	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
S5	Batido	Natural	Magro	Leite de vaca	Marca própria	Fermentos lácticos
Kefir						
K1	Líquido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos
K2	Líquido	Natural	Gordo	Leite de vaca	Marca	Fermentos lácticos

Alternativa vegetal ao iogurte								
V1	Líquido	Aroma	Meio gordo	Bebida de soja	Marca	Fermentos lácticos e Bifidobactérias		
V2	Sólido	Natural	Meio gordo	Bebida de soja	Marca	Fermentos lácticos e Bifidobactérias		
V3	Sólido	Natural	Meio gordo	Bebida de soja	Marca	Fermentos lácticos e Bifidobactérias		
V4	Sólido	Natural	Meio gordo	Bebida de soja	Marca	Fermentos lácticos e Bifidobactérias		
Total 45								

Anexo 2 – A2. Valores das contagens de bactérias LAB obtidas em alimentos fermentados (n=45).

Amostra	TEMPO® LAB (ufc/g)	Média	Desvio padrão	MRS agar (ufc/g)	Média	Desvio padrão
logurte Padrão		5,41E+06	8,81E+06		3,61E+08	2,30E+08
P1	6,80E+06			4,90E+08		
P2	1,00E+06			1,35E+08		
P3	2,00E+06			2,70E+08		
P4	5,00E+06			4,91E+07		
P5	1,00E+04			6,30E+08		
P6	2,00E+04			2,28E+08		
P7	4,00E+04			2,55E+08		
P8	4,80E+06			2,74E+06		
P9	4,70E+05			3,60E+08		
P10	4,30E+06			6,80E+08		
P11	4,90E+05			2,75E+08		
P12	1,70E+07			4,60E+08		
P13	9,00E+06			8,70E+08		
P14	4,90E+05			2,50E+08		
P15	4,90E+05			4,30E+08		
P16	3,50E+07			5,30E+08		
P17	5,00E+06			2,17E+08		
logurte Bífidos		1,12E+07	2,96E+07		5,11E+08	6,68E+08
B1	8,10E+06			7,80E+08		
B2	8,10E+06			6,70E+08		
B3	6,60E+06			2,35E+09		
B4	1,00E+08			5,64E+07		
B5	4,50E+05			6,00E+07		
B6	1,00E+04			2,48E+08		
B7	1,20E+04			4,10E+08		
B8	1,10E+05			6,80E+08		
B9	1,00E+04			8,91E+07		
B10	3,60E+04			5,64E+07		
B11	1,00E+04			2,20E+08		
logurte Grego		3,20E+06	6,81E+06		4,03E+08	2,63E+08
G1	1,70E+07			2,30E+08		
G2	9,20E+04			1,95E+08		
G3	1,00E+04			2,52E+08		
G4	1,00E+04			2,59E+08		
G5	2,10E+06			7,20E+08		
G6	1,00E+04			7,60E+08		
logurte Skyr		2,08E+05	2,58E+05		6,66E+08	5,76E+08
S1	1,00E+04			1,59E+08		

S2	1,00E+02			1,50E+02	
S3	4,90E+05			7,70E+08	
S4	4,90E+05			1,05E+09	
S5	5,00E+04			1,35E+09	
Kefir		9,01E+06	1,27E+07		1,64E+07 2,31E+07
K1	1,00E+04			2,63E+04	
K2	1,80E+07			3,27E+07	
Alternativa vegetal ao iogurte		1,83E+06	3,65E+06		9,47E+07 9,37E+07
V1	7,30E+06			4,55E+06	
V2	1,00E+04			1,44E+08	
V3	1,00E+04			2,87E+07	
V4	1,00E+04			2,02E+08	
Total 45					