

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ÁGATHA TRANSFELD DA SILVA

**IOGURTE GREGO PREBIÓTICO ISENTO DE LACTOSE ADICIONADO DE
CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE, FONTE DE CÁLCIO E RICO
EM VITAMINA D**

CURITIBA

2016

ÁGATHA TRANSFELD DA SILVA

**IOGURTE GREGO PREBIÓTICO ISENTO DE LACTOSE ADICIONADO DE
CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE, FONTE DE CÁLCIO E RICO
EM VITAMINA D**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição, área de concentração em Segurança Alimentar e Nutricional, Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Lys Mary Bileski Cândido

CURITIBA

2016

Silva, Ágatha Transfeld da
Iogurte grego prebiótico isento de lactose adicionado de concentrado proteico de soro de leite, fonte de cálcio e rico em vitamina D / Ágatha Transfeld da Silva – Curitiba, 2016.
67 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Lys Mary Bileski Cândido
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Lactose. 2. Intolerância à lactose. 3. Enzimas. 4. Hidrólise. 5. Iogurte. 6. Cálcio. 7. Vitamina D. 8. Oligossacarídeo. I. Cândido, Lys Mary Bileski. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

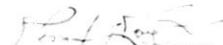
CDD 637.1476

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO

No dia sete de Julho de dois mil e dezesseis às 09:00 horas, na sala Sala 01, Av. Prof. Lothario Meissner, 632 do Setor de CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arquiração da mestranda **AGATHA TRANSFELD DA SILVA** para a Defesa Pública de sua Dissertação intitulada "**loqrte grego prebiótico isento de lactose adicionado de concentrado proteico de soro de leite, fonte de cálcio e rico em vitamina D**". A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: LYS MARY BILESKI CÂNDIDO (UFPR), ALESSANDRO NOGUEIRA (UEPG), MIGUEL DANIEL NOSEDA (UFPR). Dando início a sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arquirações. A aluna respondeu a cada um dos arquiradores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a mestranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela **aprovação** da aluna. A mestranda foi convidada a imprimir novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, LYS MARY BILESKI CÂNDIDO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 07 de Julho de 2016.


Prof LYS MARY BILESKI CÂNDIDO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


Prof ALESSANDRO NOGUEIRA
Avaliador Externo (UEPG)


Prof MIGUEL DANIEL NOSEDA
Avaliador Externo (UFPR)



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por estar sempre me protegendo, guiando e permitindo que eu siga em frente.

Ao meu marido, que se fez presente em todos os momentos desta caminhada, me deu todo o suporte, carinho, amor e, adicionalmente, me auxiliou nas diversas noites que passei no laboratório, nas formatações dos trabalhos desenvolvidos e demais atividades.

À minha irmã Samantha Transfeld, por participar de forma direta, ativa e metódica em todo o desenvolvimento da minha pesquisa. Obrigada pela incrível disponibilidade oferecida.

À minha família, incluindo meus sogros e minha irmã de coração Agda Novais, pelo apoio, amor, acolhimento e incentivo sempre que mostrei fraqueza e insegurança.

À professora Lys Mary Candido, obrigada por acreditar em meu potencial de uma forma que eu não acreditava ser capaz de corresponder. Você foi e é referência profissional e pessoal para meu crescimento.

À professora Cláudia Kruger, por dividir comigo seus conhecimentos.

À Priscila Reis e Juliana Atherino, pelos dias e noites dedicados ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Jair Lima, Adriana Serenato, Maurício Passos e Jaqueline Leobet, que tiveram paciência e me ensinaram a desenvolver atividades, que até então, eram desconhecidas por mim. Sou extremamente grata!

À empresa Sooro, pelo acesso, disponibilidade e trabalho em equipe, onde por meio desta pesquisa pudemos produzir um produto de interesse.

À empresa Frimesa, pelo auxílio e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

A turma de mestrado (PPGAN 2014), vocês foram as melhores companhias!

Finalmente, gostaria de agradecer à Universidade Federal do Paraná (UFPR) por me permitir a realizar parte da grande ambição que tive desde o momento que escolhi cursar Nutrição, ou seja, me tornar docente e pesquisadora.

Como a professora Lys Mary sempre diz: Um trabalho bem feito é aquele desenvolvido por um grupo de profissionais competentes em sua área de conhecimento. Obrigada a todos!

RESUMO

O leite bovino constitui uma das mais completas fontes alimentares nos quesitos carboidratos, proteínas e gorduras. Verifica-se a necessidade de explorar e desenvolver alternativas tecnológicas que promovam a inclusão deste alimento e seus derivados na dieta de indivíduos com restrições à ingestão de lactose. O desenvolvimento de formulações de iogurte visa aumentar a oferta de produtos destinados a estes indivíduos, considerando suas limitações no que diz respeito à questão alimentar e nutricional, e ainda, promover o aporte de nutrientes importantes que, devido a esta condicionalidade, pode estar comprometido. Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver formulações de iogurte grego prebiótico isento de lactose, adicionado de concentrado proteico de soro de leite, cálcio e rico em vitamina D destinado ao consumo por pessoas intolerantes à lactose. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa sob o CAAE nº 39499414.6.0000.5547. Foram aplicados dois delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCR), um para a realização da hidrólise do concentrado proteico de soro de leite e outro para as formulações dos iogurtes. As três melhores formulações quanto aos atributos viscosidade, sinérese, firmeza e elasticidade foram avaliadas sensorialmente por provadores não treinados. Os DCCRs foram desenvolvidos por meio do programa Statistica versão 7,0. Os dados relacionados à caracterização dos produtos e à comparação dos resultados obtidos foram avaliados utilizando-se o programa SPSS *Statistcs* versão 22. Para execução do teste sensorial de aceitação foi utilizado o programa *Fizz Sensory Software* 2.47B. Para a enzima Lactozym Pure 6500 L, a variação de sua concentração na faixa ótima foi de 0,25 a 0,30% e tempo de 125 a 150 min. Para a enzima Maxilact LGX 5000, estas faixas foram iguais a 0,23 a 0,28% e 125 a 150 min. Com ambas as enzimas foi possível alcançar 100% de hidrólise da lactose. A aplicação do concentrado proteico de soro de leite isento de lactose promoveu as características reológicas estudadas (viscosidade, firmeza, elasticidade), além de reduzir a sinérese e, ainda, incrementar o aporte proteico e de cálcio dos iogurtes desenvolvidos. Três formulações, contendo as concentrações mais elevadas das variáveis independentes estudadas (concentrado proteico de soro de leite isento de lactose e leite em pó isento de lactose), obtiveram médias de aceitabilidade geral iguais a $6,61 \pm 1,71$; $6,70 \pm 1,74$; $6,57 \pm 1,78$. As médias se mantiveram na faixa entre o ponto 7 (gostei moderadamente) e o ponto 6 (gostei ligeiramente). Os resultados evidenciaram que a aplicação, em iogurtes, de concentrado proteico de soro de leite isento de lactose pode ser considerada uma prática com grande potencial, podendo ser amplamente explorada.

Palavras-chave: Lactose. Intolerância à lactose. Enzimas. Hidrólise. Iogurte.
Cálcio. Vitamina D. Oligossacarídeo.

ABSTRACT

The cow's milk is one of the most complete food sources in the matter of carbohydrates, proteins and fats. There is a need to explore and develop technologic alternatives to promote the inclusion of this food and its derivatives in the diet of individuals with intake of lactose restrictions. The development of yogurt formulations aims to increase the supply of products designated to these individuals, considering their limitations regarding food and nutrition matters and also promote the intake of important nutrients that, due to this compliance, may be compromised. Therefore, the goal of this study was to develop lactose free prebiotic greek yogurt, added of whey protein concentrate, source of calcium and rich in vitamin D destined to be consumed by lactose-intolerant people. The study was approved by the Ethics Committee in Research under the CAAE nº 39499414.6.0000.5547. Two central composite designs were applied (CCD), one to perform the hydrolysis of the whey protein concentrate and the other for the formulations of yogurts. The top three formulations as to viscosity, syneresis, firmness and elasticity attributes were sensorially evaluated by untrained evaluators. The CCDs were developed through the program Statistica version 7.0. The data related to the characterization of products and the comparison of results was evaluated using the program SPSS Statistics version 22. For the execution of the sensorial acceptance test it was used the program Fizz Sensory Software 2.47B. For Lactozym Pure 6500 L enzyme, the variation of its concentration at the optimum range was 0.25 to 0.30% and time of 125 to 150 min. For Maxilact LGX 5000 enzyme, these ranges were equal to 0.23 to 0.28% and 125 to 150 min. It was possible to achieve 100% lactose hydrolysis with both enzymes. The application of the lactose-free whey protein concentrate promoted the studied rheological characteristics (viscosity, firmness, elasticity), besides of reducing the syneresis and, also, increasing the protein and calcium content of the developed yogurts. Three formulations containing higher concentrations of the independent variables studied (lactose-free whey protein concentrate and lactose-free powder milk) obtained averages of overall acceptability equal to 6.61 ± 1.71 , 6.70 ± 1.74 , and 6.57 ± 1.78 . The average remained between the range of point 7 (moderately liked) and the point 6 (slightly liked). The results showed that the application, in yogurts, of lactose-free concentrate whey protein can be considered a practice with great potential, it can be widely explored.

Keywords: Lactose. Lactose intolerance. Enzymes. Hydrolysis. Yogurt. Calcium. Vitamin D. Oligosaccharide.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA INICIAL DE CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE.....	45
FIGURA 2 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA E CURVAS DE CONTORNO PARA O GRAU DE HIDRÓLISE (%) COM A ENZIMA LACTOZYM PURE 6500 L E MAXILACT LGX 5000 EM FUNÇÃO DO TEMPO (MIN) E DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA (%).....	47
FIGURA 3 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE APÓS VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL COM A ENZIMA LACTOZYM PURE 6500 L E MAXILACT LGX 5000.....	48
FIGURA 4 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA E CURVAS DE CONTORNO PARA A VISCOSIDADE (MPA.S) E SINÉRESE (%) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CPSIL (%) E LPIL (%).....	53

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DO SORO ÁCIDO E DOCE.....19

ARTIGO

TABELA 1 - VARIÁVEIS CODIFICADAS E COM NÍVEIS DE VARIAÇÃO PARA A
HIDRÓLISE DO CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE E
PARA AS FORMULAÇÕES DOS IOGURTES.....40

TABELA 2 - VALORES DE VISCOSIDADE, FIRMEZA, ELASTICIDADE E
SINÉRESE DAS FORMULAÇÕES54

TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES.....55

TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO PROTEICA DE IOGURTES GREGOS ZERO
LACTOSE COMERCIALIZADOS NO BRASIL.....56

TABELA 5 - AVALIAÇÃO SENSORIAL DAS FORMULAÇÕES.....61

LISTA DE SIGLAS

- AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta
- CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CPS - Concentrado Proteico de Soro de Leite
- CPSIL - Concentrado Proteico de Soro de Leite Isento de Lactose
- DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio
- DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional
- FOS - Frutooligossacarídeo
- LPIL - Leite em pó isento de lactose
- NLU - Neutral Lactose Units (Unidades de Lactose Neutra)
- SAN - Segurança Alimentar e Nutricional
- TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- UFC - Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	OBJETIVOS	13
1.1.1	Objetivo geral	13
1.1.2	Objetivos específicos	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	CLASSIFICAÇÃO DA MÁ-ABSORÇÃO DA LACTOSE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	15
2.2	DIAGNÓSTICO DE INTOLERÂNCIA À LACTOSE	16
2.3	LEITES E DERIVADOS: UTILIZAÇÕES E INOVAÇÕES	17
2.4	CÁLCIO	22
2.5	VITAMINA D	22
2.6	FRUTOOLIGOSSACARÍDEO	24
3	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26
	ARTIGO	31

1 INTRODUÇÃO

O leite bovino é considerado um alimento de alto grau de complexidade em relação a sua composição nutricional (HAUG; HOSTMARK; HARSTAD, 2007). Seu principal carboidrato é a lactose, que contribui no processo de absorção intestinal de cálcio (KWAK; LEE; LEE, 2012). A concentração média no soro, porção que apresenta a maior parte deste açúcar, é de aproximadamente 5% (SOUZA et al., 2010).

O leite contém uma alta proporção de ácidos graxos saturados, apresenta também, ácido graxo monoinsaturado oléico e ácido graxo linoleico conjugado. O perfil proteico é caracterizado pela presença balanceada de aminoácidos essenciais. Este produto e seus derivados podem contribuir para a adequada ingestão diária de nutrientes como cálcio, magnésio, selênio, riboflavina, vitamina A, D e do complexo B, zinco, ácido pantotênico, fósforo e potássio (MUEHLHOFF; BENETT; MCMAHON, 2013).

No entanto, mesmo sendo considerados alimentos com excelentes fontes de nutrientes e amplamente consumidos, o leite e seus derivados não podem ser ingeridos por uma significativa parcela da população, devido à redução na produção e eficiência da atividade da enzima β -galactosidase, popularmente conhecida como lactase, responsável pela hidrólise da lactose (MUEHLHOFF; BENETT; MCMAHON, 2013).

A prevalência da má-absorção da lactose na população mundial é de aproximadamente 70% (MUEHLHOFF; BENETT; MCMAHON, 2013). Devido a variações genéticas ocorridas em algumas populações, a produção de lactase é programada para decrescer com o decorrer do tempo. Asiáticos, sul-africanos e americanos nativos do sul apresentam as maiores prevalências de produção reduzida de lactase. Populações pertencentes à Europa Central e do Norte apresentam prevalências extremamente baixas, havendo o favorecimento de produção contínua de lactase para a grande maioria destes (ENATTAH et al., 2002). No Brasil, a prevalência de deficiência da enzima lactase é de, aproximadamente, 56% em brancos e morenos, 80% em negros e 100% em japoneses (MATTAR et al., 2009). O estudo conduzido por Friedrich et al. (2012), identificou que 48,6% das pessoas avaliadas pertencentes à região Sul do Brasil com ancestralidade europeia apresentaram genes associados à não persistência da enzima lactase; as pessoas

avaliadas nesta mesma região com ascendência africana apresentaram a frequência de 68,1%. No Norte este valor foi igual a 69% e no Nordeste do Brasil 63,4%.

Verifica-se, portanto, a necessidade em assumir a corresponsabilidade na promoção da Segurança Alimentar e Nutricional no Brasil (SAN), mediante ampliação, inovação e aperfeiçoamento dos produtos disponíveis de maneira a atender a demanda crescente de consumidores que apresentam restrição quanto à ingestão de lactose, e que conseqüentemente, diminuem e/ou deixam de ingerir o leite e seus produtos derivados (BRASIL, 2006).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo colaborar com a segurança alimentar e nutricional de intolerantes à lactose, de maneira a realizar a completa hidrólise da lactose presente no concentrado proteico de soro de leite para aplicação em iogurtes gregos prebióticos, isentos de lactose, fontes de cálcio e ricos em vitamina D.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver iogurte grego isento de lactose, adicionado de concentrado proteico de soro de leite, cálcio, vitamina D e frutooligossacarídeo (FOS) destinado ao consumo por pessoas intolerantes à lactose.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Comparar a eficiência de duas enzimas comerciais na hidrólise da lactose do concentrado proteico de soro de leite;
- b) Estabelecer as condições experimentais a fim de promover a completa hidrólise da lactose do concentrado proteico de soro de leite;
- c) Elaborar formulações de iogurtes a partir de diferentes proporções de concentrado proteico de soro de leite isento de lactose e leite em pó isento de lactose;
- d) Avaliar o impacto da adição do concentrado proteico de soro de leite isento de lactose e do leite em pó isento de lactose nas propriedades reológicas do iogurte;

- e) Avaliar a aceitação sensorial de iogurtes elaborados a partir de concentrado proteico de soro de leite isento de lactose, leite em pó isento de lactose, frutooligossacarídeo, cálcio e vitamina D.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CLASSIFICAÇÃO DA MÁ-ABSORÇÃO DA LACTOSE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Em condições ideais, durante o processo de digestão de produtos lácteos, quando a lactose atinge a borda em escova intestinal, principalmente no jejuno, local onde a enzima lactase encontra-se em maior concentração, ocorre a hidrólise enzimática deste dissacarídeo, processo que resulta na liberação de moléculas de galactose e glicose, que são absorvidos pelos enterócitos (MATTAR; MAZO, 2010).

Em indivíduos intolerantes à lactose, como resultado da hipolactasia, são evidenciadas diversas consequências ao organismo, uma delas ocorre no lúmen intestinal, onde a lactose que não foi degradada aumenta a osmolaridade local, atraindo água e eletrólitos, ocasionando assim, diarreia. Devido ao processo de aumento de osmolaridade, eleva-se a velocidade do trânsito intestinal, favorecendo e acentuando a má absorção de nutrientes. Quando a capacidade de absorção da lactose é excedida, esta chega ao cólon, onde irá passar pelo processo de fermentação por bactérias da microbiota do intestino resultando em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), tais como propionato, butirato e acetato, e ainda, dióxido de carbono, hidrogênio e metano. Em decorrência, as fezes apresentam-se mais ácidas e líquidas, ocasionando distensão abdominal, borborigmos, dor e hiperemia perianal, sintomas estes comuns na intolerância à lactose (LEVITT; WILT; SHAUKAT, 2013).

Os indivíduos com intolerância à lactose podem ainda apresentar constipação, náuseas, vômitos, dores de cabeça, falta de concentração e cansaço exacerbado (MATTHEWS et al., 2005).

A hipolactasia ou deficiência da enzima lactase pode ser classificada de três formas distintas: congênita, primária e secundária (DI RIENZO et al., 2013).

A deficiência congênita é herdada e autossômica recessiva, sendo uma condição extremamente grave e rara que persiste durante a vida inteira, requerendo a exclusão completa de fontes de lactose. Caso não seja diagnosticada precocemente pode levar a óbito (HEYMAN, 2006).

A deficiência primária ou “não persistente” é a mais comum, visto que, ocorre devido ao declínio da atividade da lactase durante o curso da vida, sendo este decréscimo geneticamente programado. A intensidade dos sintomas é variável,

pois, fatores como: quantidade consumida de lactose, idade do indivíduo, taxa de digestão, genética e raça, são singulares, diferindo de pessoa para pessoa (DI RIENZO et al., 2013).

A deficiência secundária é resultante de lesões na mucosa do intestino como, por exemplo, o uso de radiação e de medicações para o tratamento de câncer. Gastroenterites, doença de Crohn, colite ulcerativa, doença celíaca, e outras condições que afetam o trato intestinal, também podem ocasionar danos à mucosa. Após a recuperação das lesões, geralmente, a atividade da lactase é restabelecida (TOMAR, 2014).

Cabe salientar que parte dos intolerantes à lactose consegue degradar uma dose restrita de lactose sem o desencadeamento de sintomas severos, o que corresponde a um copo de leite por dia, ou seja, aproximadamente 12 g de lactose, o excedente desta quantidade pode ocasionar os sintomas supracitados (HEYMAN, 2006; SHAUKAT et al., 2010; SUCHY et al., 2010).

2.2 DIAGNÓSTICO DE INTOLERÂNCIA À LACTOSE

Levitt, Wilt e Shaukat (2013) apresentam as diferenças entre intolerância à lactose e má-absorção de lactose. A intolerância é definida pelo aparecimento de sintomas provenientes da insuficiência da enzima lactase, e a má-absorção é caracterizada apenas por uma digestão insuficiente de uma dose definida de lactose, normalmente 25 a 50 g.

A intolerância à lactose pode ser diagnosticada através do teste respiratório do hidrogênio expirado. Em jejum, antes e após a ingestão de 25 g a 50 g de lactose, observa-se a taxa de hidrogênio expirado acima dos limites aceitáveis (MATTHEWS et al., 2005). Outra forma de constatação é por meio do teste sanguíneo de tolerância à lactose, no qual a pessoa recebe uma dose de 25 g a 50 g de lactose em jejum. Antes e após a ingestão, são colhidas amostras de sangue que indicam os níveis de glicose, sendo possível identificar o metabolismo deste açúcar através de curva glicêmica (RIDEFELT; HAKANSSON, 2005). E ainda, através do exame genético, no qual é possível associar a atividade da enzima lactase através da existência de polimorfismos do gene MCM6 (MATTAR; MAZO, 2010).

Kull, Kallikorm e Lember (2009) discutem a relação entre a existência de

polimorfismos do gene MCM6 e a auto-percepção de intolerância à lactose com a redução na ingestão de leite. Verificaram os sucessivos casos da autopercepção quanto à intolerância à lactose e sugerem que esta concepção está relacionada diretamente com a redução de ingestão de leite. Para os autores, esta autoimposição de redução na ingestão deste produto não apresentou relação direta com a deficiência na enzima lactase. Em suma, concluíram que esta atitude pode trazer impactos negativos sobre a saúde destas pessoas, principalmente, ao que se relaciona com a integridade óssea.

2.3 LEITES E DERIVADOS: UTILIZAÇÕES E INOVAÇÕES

A aquisição brasileira de leite cru realizada pelos estabelecimentos que atuam sob inspeção (federal, estadual ou municipal) no ano de 2015 foi igual a 24,05 bilhões de litros (BRASIL, 2016).

Por meio do leite podem ser elaborados inúmeros produtos, como é o caso do iogurte. A produção brasileira de iogurtes foi igual a 727,134 toneladas em 2013 (BRASIL, 2013). De acordo com a Instrução Normativa do Ministério da Agricultura nº 46/07 (BRASIL, 2007), o iogurte é definido como o produto cuja fermentação se realiza com cultivos protossimbióticos de *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, os quais podem ser acompanhados, complementarmente, de outras bactérias ácido-lácticas.

A presença das bactérias lácticas pode contribuir com a redução de, aproximadamente, 30% da lactose presente no iogurte (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012). Sendo assim, parte dos intolerantes à lactose consegue ingerir este produto sem o desencadeamento de sintomas graves (BROWN-ESTERS; NAMARA; SAVAIANO, 2012).

Em sua composição, o iogurte deve apresentar obrigatoriamente, leite e/ou leite reconstituído padronizado em seu conteúdo de gordura, além das bactérias lácticas. Como ingredientes opcionais, pode-se utilizar proteínas lácteas, outros sólidos de origem láctea, soros lácteos, concentrados de soros lácteos, leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra de leite ou *butter oil*, leite em pó, caseinatos alimentícios, e ainda, diferentes ingredientes alimentícios como frutas, açúcares e/ou glicídios, maltodextrinas, mel, coco, cereais, vegetais, frutas secas, especiarias e café, sós ou combinados. Pode-se utilizar amidos ou amidos

modificados em uma proporção máxima de 1% (m/m) do produto final. Os ingredientes opcionais não-lácteos deverão estar presentes em uma proporção máxima de 30% (m/m) do produto final (BRASIL, 2007).

Sobre os aspectos físico-químicos, o iogurte pode ser classificado conforme seu conteúdo de matéria gorda: com creme (mínimo 6,0 g/100 g), integral (3,0 a 5,9 g/100 g), parcialmente desnatado (0,6 a 2,9 g/100 g) e desnatado (máximo de 0,5 g/100 g), acidez (expressa em ácido láctico/100 g) de 0,6 a 1,5, proteínas acima de 2,9 g/100 g e contagem de bactérias lácticas totais viáveis durante todo o período de validade do produto de, no mínimo, 10^7 (UFC/g) (BRASIL, 2007).

Em relação às versões de lácteos resfriados no volume de vendas, os iogurtes com polpas de frutas participam em 25,2%, seguidos por iogurtes líquidos familiar (24,9%), leites fermentados (9,8%), iogurtes líquidos individuais (8,5%), iogurtes funcionais (7,3%), iogurtes naturais (6,4%), iogurtes concentrados (6%), iogurtes petit suisse (5,3%), iogurtes *diet/light* (3,1%), sobremesas (2,6%), iogurtes sem lactose (0,9%) (SUPERMERCADO MODERNO, 2016).

Apesar do iogurte concentrado contribuir de maneira significativa em relação ao volume de vendas, a legislação brasileira vigente não abrange este tipo de iogurte, também denominado no Brasil e Grécia como grego ou labneh no Oriente Médio, porém, segundo o *Codex Alimentarius*, a diferenciação entre iogurte e iogurte concentrado é o teor proteico, sendo que, no caso deste último, o teor deve ser de, no mínimo, 5,6% de proteína (FAO; WHO, 2011).

No que se refere ao soro de leite, considerado como um subproduto da indústria de laticínios, este se caracteriza por ser o líquido remanescente originado através da coagulação do leite destinado a elaboração de queijos, sendo que, para cada quilo de queijo produzido, são gerados, em média, nove litros de soro de leite (CÂNDIDO; KRUGER, 2012). O soro é um dos grandes poluentes do setor, pois, muitas vezes as empresas difundem em cursos de água seus efluentes líquidos sem utilizar um adequado tratamento, e devido ao alto conteúdo de matéria orgânica presente no soro, exige-se uma elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) para oxidar estes compostos (TEIXEIRA, 2011).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção brasileira de soro de leite modificado ou não teve crescimento ascendente desde 2005, visto que, no ano de 2013 esta produção foi igual a 1,241.321 litros (BRASIL, 2013), o que corresponde a um elevado volume de geração deste produto.

O soro de leite possui mais da metade de sólidos presentes no leite integral original, a fração proteica é composta por β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina, imunoglobulinas e glicomacropéptido, e em menor quantidade, lactoferrina e lactoperoxidase, que representam 20% das proteínas do leite. Apresenta minerais e vitaminas hidrossolúveis, sobretudo do complexo B e a maioria da lactose (ORDÓÑEZ, 2005).

A seguir, encontra-se a TABELA 1 contendo a composição do soro do tipo ácido (pH 4,5-5,5) obtido por meio da coagulação do leite por acidificação e do tipo doce (pH 5,5-6,5), chamado assim por não ter sido tratado com ácido, onde a coagulação se produz, principalmente, por ação enzimática (HARPER; SHIBERLING, 1976).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DO SORO ÁCIDO E DOCE

Componentes (%)	Soro ácido	Soro doce
Água	94-95	93-94
Sólidos totais	5,2	6,5
Lactose	4,3	4,9
Proteína bruta (N x 6,38)	0,6	0,8
Nitrogênio não proteico (% N do total)	27	22
Ácido láctico	0,7-0,8	0,1-0,2
Cinza	0,7	0,5

FONTE: Harper e Shiberling (1976).

As proteínas de soro de leite apresentam todos os aminoácidos essenciais (SGARBIERI, 2004). Incluindo os aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), sendo reconhecidas como proteínas de alto valor biológico e de rápida absorção (HULMI; LOCKWOOD; STOUT, 2010).

Estas proteínas possuem ainda propriedades funcionais que permitem modificações sensoriais desejadas quando utilizadas como ingredientes em alimentos (SGARBIERI, 1996). A funcionalidade das proteínas do soro de leite está relacionada com sua alta solubilidade, capacidade de dispersão, ligação de água, formação de espuma, emulsificação, geleificação e poder tamponante. Estas funções podem proporcionar benefícios como: manutenção da umidade, melhora na textura e sensação tátil bucal, prevenção da sedimentação, criação de emulsões estáveis, realçador de sabor (CÂNDIDO; KRUGER, 2012).

Em razão da atratividade de suas propriedades nutricionais e funcionais, várias técnicas foram desenvolvidas a fim de fracionar, de maneira seletiva, seus nutrientes. Através do processamento desse subproduto, podem ser elaborados concentrados ou isolados proteicos de soro de leite com alto teor de proteínas, sendo uma alternativa de uso racional e sustentável (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011).

Para a produção comercial de frações do soro de leite, existem duas principais categorias de métodos: separação por membranas e cromatografia de troca iônica (EL-SAYED; CHASE, 2011).

O uso de membranas, em especial a ultrafiltração, é um método atrativo para recuperação comercial de proteínas a partir do soro. Devido ao tamanho de suas moléculas, estas são retidas, enquanto a lactose e as cinzas, de baixa massa molar, são capazes de passar através da membrana, entretanto, concentrações razoáveis de lactose podem permanecer no retentado. Este retentado é evaporado a vácuo e alimentado em secadores *spray dryers* para produção de soro de leite em pó, concentrados proteicos de soro de leite em pó e isolados proteicos de soro de leite em pó. A diafiltração é um processo que pode ser realizado adicionalmente à ultrafiltração a fim de aumentar a concentração de proteínas do produto final e, conseqüentemente, reduzir a lactose do mesmo (YEE; WILEY; BAO, 2007).

O método cromatográfico consiste na troca iônica realizada quando o soro percorre a coluna contendo substâncias que interagem com a amostra, adsorvendo grande parte da proteína presente, que posteriormente, é eluída com adição de solução tampão (EL-SAYED; CHASE, 2011).

Os concentrados proteicos de soro de leite (CPS) disponíveis comercialmente podem conter de 35 a 90% de proteína, os isolados proteicos apresentam uma quantidade mínima de 90% de proteína (ANTUNES, 2003).

A legislação brasileira vigente não aborda, especificamente, os concentrados e isolados proteicos de soro de leite. Conforme decreto nº 30.691 (BRASIL, 1952), a classificação que se tem é de leite desidratado, sendo este o produto derivado da desidratação parcial do leite (leite concentrado, evaporado, condensado e doce de leite), ou pela desidratação total do leite (leite em pó e farinhas lácteas).

O *Codex Alimentarius* também não possui esta especificação, o mesmo define o que é leite em pó, sendo este o produto obtido por meio da remoção parcial

da água presente no leite. Neste, o teor proteico pode ser ajustado, desta forma, existe a definição de retentado do leite, que é o produto resultante da concentração, por ultrafiltração, das proteínas do leite apresentando, no mínimo, 34% de proteína dos sólidos totais do leite (sem gordura). No que se trata do soro de leite em pó, este é definido como o produto derivado do leite, obtido por meio de secagem do soro resultante da coagulação da caseína por meio de adição de enzima ou acidificação (FAO; WHO, 2011).

Apesar de não possuírem, especificamente, um regulamento técnico de identidade e qualidade a nível nacional, as proteínas do soro de leite, em suas distintas formas de apresentação, possuem aplicações em diversos alimentos, como iogurtes, bebidas lácteas, compostos lácteos, bebidas, massas, barras energéticas, embutidos, sopas, sobremesas e produtos de panificação (PATEL, 2015).

Desta forma, o concentrado proteico de soro de leite pode ser utilizado em substituição ao leite em pó desnatado, que normalmente é aplicado industrialmente em produtos lácteos como iogurtes, objetivando adequar o teor de sólidos totais presente no produto e melhorar os atributos relacionados à textura. O CPS pode ainda ser considerado um substituto de gorduras (GUZMAN-GONZALES et al., 1999).

Para a utilização de leite, concentrado proteico de soro de leite e outros derivados, objetivando o desenvolvimento de produtos destinados aos intolerantes à lactose, dá-se destaque à hidrólise enzimática do dissacarídeo em questão, onde por meio desta, originam-se dois monossacarídeos: glicose e galactose. Este processo pode ser utilizado em escala industrial e com relativa viabilidade econômica e os açúcares resultantes possuem poder edulcorante e solubilidade superiores ao da lactose (GANZLE; HAASE; JELEN, 2008). Neste segmento, com o intuito de aumentar a doçura e reduzir a utilização de sacarose em produtos lácteos, a adição de lactose e realização do processo de hidrólise deste açúcar nestes alimentos vem se tornando uma alternativa de interesse e investigação (LI et al., 2015).

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) as enzimas utilizadas em alimentos devem ser provenientes de micro-organismos geralmente reconhecidos como seguros (*GRAS – generally recognized as safe*). São reconhecidas como *GRAS* as enzimas lactases derivadas de *Candida pseudotropicalis* e *Kluyveromyces lactis* (UNITED STATES OF AMERICA, 1984,

1996). No Brasil, as enzimas lactases reconhecidas como seguras são provenientes de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *lactis e marxianus*, *Saccharomyces* sp (BRASIL, 2014).

2.4 CÁLCIO

Os produtos lácteos representam as principais fontes de cálcio da dieta, pois possuem maior biodisponibilidade do elemento cálcio e maiores percentuais de absorção deste mineral quando comparados a outras fontes alimentares (BUZINARO; ALMEIDA; MAZETO, 2006). Desse modo, pode-se considerá-los de extrema valia para o adequado suprimento de micro e macronutrientes essenciais para a manutenção da saúde (PEREIRA, 2014).

O cálcio está associado majoritariamente à micela de caseína, mas também, em menor concentração, às proteínas do soro de leite (RAHIMI-YAZDI; FERRER; CORREDIG, 2010). Uma pequena porção, inferior a 10%, encontra-se na forma de cálcio iônico (Ca^{2+}), forma biologicamente ativa do mineral (LEWIS, 2011).

Os processos que envolvem a aplicação de altas temperaturas e pressões promovem redução na concentração de cálcio (LEWIS, 2011). Além disso, a ingestão adequada deste mineral pode estar comprometida por determinadas pessoas, como por exemplo, idosos com redução da ingestão alimentar e/ou intolerantes à lactose, que diminuem ou deixam de consumir leite e derivados (BONJOUR; BENOIT; PAYEN; KRAENZLIN, 2013).

O cálcio faz parte da composição dos ossos e dentes, além de, estar envolvido nos processos de transmissão nervosa, contração e vasodilatação muscular e secreção hormonal (BETO, 2015).

Considerando o papel do cálcio na manutenção da saúde e, ainda, a perda deste mineral no processamento de produtos alimentícios ou comprometimento na ingestão de alimentos fontes de cálcio, a suplementação de cálcio em produtos alimentícios pode vir a colaborar com o atendimento da ingestão recomendada diária deste mineral.

2.5 VITAMINA D

A vitamina D é um hormônio esteróide produzida de forma endógena, nos

tecidos cutâneos após a exposição solar, bem como, obtida pela ingestão de alimentos específicos, que possuem naturalmente esta vitamina como peixes e seus óleos, fígado, e em baixas concentrações, em leite e ovos ou por suplementação. A luz solar fornece a maior parte do requerimento de vitamina D diário, porém, fontes dietéticas podem contribuir com a adequação dos níveis desta vitamina, principalmente em regiões com baixa incidência de sol durante o ano (HOLICK, 2008).

Devido a grande aceitação e consumo dos produtos lácteos pela população em geral, evidencia-se a importância da adequada ingestão e absorção de nutrientes que estes podem oferecer, principalmente aos intolerantes à lactose (HEANEY, 2013). Sendo assim, a utilização de nutrientes específicos em suas composições, como a vitamina D, pode contribuir positivamente em determinadas questões, dando destaque à estruturação e integridade imunológica e óssea (BONJOUR; BENOIT; PAYEN; KRAENZLIN, 2013).

A quantidade de cálcio absorvido por meio da dieta é dependente da quantidade de consumo e da eficiência do processo de absorção deste nutriente. Este processo de absorção é regulado por hormônios específicos, particularmente, 1,25-diidroxi-vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$), a vitamina D em sua forma ativa, conhecida como calcitriol (FLEET; SCHOCH, 2010).

Nas células endoteliais do intestino, um dos principais órgãos de atuação da vitamina D, há o estímulo da absorção ativa de cálcio no duodeno e passiva no jejuno; nos rins, este hormônio promove a reabsorção do cálcio filtrado (CASTRO, 2011).

Além da atuação da vitamina D sobre o metabolismo de cálcio e consequentemente integridade e saúde óssea, esta vitamina apresenta ações que ultrapassam esta temática. Christakos et al. (2013) referem a atividade da vitamina D na modulação do sistema imune, além disso, indicam o potencial efeito da vitamina no controle e prevalência das morbidades relacionadas às doenças cardiovasculares, no desenvolvimento muscular em idosos e no controle glicêmico (CHRISTAKOS et al., 2013).

Verifica-se que ainda são poucos os produtos fortificados com vitamina D, considerando as ações e benefícios providos por esta vitamina, sendo então, benéfica sua maior utilização em alimentos, principalmente aqueles destinados a intolerantes à lactose (HOLICK, 2007).

2.6 FRUTOOLIGOSSACARÍDEO

O frutooligossacarídeo (FOS) é um oligossacarídeo constituído de monômeros de frutoses ligadas linearmente na posição β -2,1 e terminalmente apresenta uma molécula de glicose (QIANG; YONGLIE; QIANBING, 2009).

Pode ser encontrado amplamente no reino vegetal, estando presente em monocotiledôneas, dicotiledôneas e em algas verdes. Chicória, alho, cebola e banana, são alguns exemplos de alimentos que possuem frutooligossacarídeo em sua composição (BENKEBLIA, 2013).

Esta substância não é digerível atuando como prebiótico e modulando a microbiota intestinal, exibindo assim, um papel importante aos intolerantes à lactose que muitas vezes apresentam desequilíbrio na composição das bactérias comensais endógenas presentes no intestino. O FOS é fermentado pelas bactérias benéficas do cólon, lactobacilos e bifidobactérias, formando ácidos graxos de cadeia curta que possuem a capacidade de impulsionar a proliferação celular do enterócito, além de estimular o funcionamento do sistema imune e, ainda, regular o metabolismo lipídico limitando a lipogênese e colesterogênese (SABATER-MOLINA et al., 2009; ROBERFROID, 2010).

Este componente de origem alimentar possui ação indireta benéfica sobre a absorção de minerais, principalmente de cálcio. A produção dos ácidos graxos de cadeia curta promove a diminuição do pH intestinal que converte o cálcio insolúvel em sua forma iônica favorecendo sua absorção (PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015).

Além dos benefícios nutricionais, o FOS apresenta propriedades tecnológicas, sendo um substituto da sacarose, possuindo grande capacidade de retenção de água, alta solubilidade e estabilidade e baixa oferta energética (SABATER-MOLINA et al., 2009). Devido a sua capacidade geleificante, o FOS pode ser utilizado em produtos alimentícios com teores reduzidos de gordura, mantendo assim a emulsão (AL-SHERAJI et al., 2013).

3 CONCLUSÃO

Desta forma, é possível identificar a necessidade em valorizar ainda mais, no quesito nutricional, os produtos destinados aos intolerantes à lactose.

A adição, em produtos lácteos, de vitamina D, encontrada naturalmente em concentrações satisfatórias em limitados alimentos, como peixes e seus óleos; e de frutooligossacarídeo, fibra alimentar solúvel, possuem a capacidade de aumentar a absorção do mineral cálcio, além de promover ações específicas no organismo humano (PEREIRA; GENARO; PINHEIRO; SZEJNFELD; MARTINI, 2009). Estudos indicam significativa associação entre a má-absorção da lactose ou auto-percepção desta condicionalidade e o baixo consumo de cálcio e vitamina D, sendo assim, o desenvolvimento de produtos alimentícios que atendam esta condição pode auxiliar na adequada ingestão destes nutrientes (MADRY et al., 2012; BARR, 2013; LEHTIMÄKI et al., 2006).

Ainda com a intenção de incrementar a composição nutricional e, especialmente, de proporcionar melhorias no aspecto sensorial de produtos alimentícios, a adição de concentrado proteico de soro de leite, produto obtido por meio do soro, considerado um sub-produto da indústria de laticínios, pode aumentar o aporte proteico e, ainda, promover os atributos relacionados à viscosidade e textura quando adicionado em outros alimentos (TEIXEIRA, 2011; CÂNDIDO; KRUGER, 2012).

REFERÊNCIAS

- AL-SHERAJI et al. Prebiotics as functional foods: a review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1542-1553, 2013.
- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. 1 ed. Barueri: Manole, 2003.
- BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, n. 1, p. 381–386, 2011.
- BARR, S. I. Perceived lactose intolerance in adult Canadians: a national survey. **Applied physiology nutrition and metabolism**, v. 38, n. 8, p. 830-835, 2013.
- BENKEBLIA, N. Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops. **Journal of Chromatography A**, v. 1313, p. 54-61, 2013.
- BETO, J. The role of calcium in human aging. **Clinical Nutrition Research**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2015.
- BONJOUR, J. P.; BENOIT, V.; PAYEN, F.; KRAENZLIN, M. Consumption of Yogurts Fortified in Vitamin D and Calcium Reduces Serum Parathyroid Hormone and Markers of Bone Resorption: A Double-Blind Randomized Controlled Trial in Institutionalized Elderly Women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 7, p. 2915-2921, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 jun. 1952. Seção 1, p. 8.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Banco de dados agregados**. 2013. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=5806&z=p&o=19>>. Acesso em: 11 jul. 2016.
- BRASIL. Lei 11.346 de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. (Lei Orgânica de Segurança Alimentar e Nutricional). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 179, 15 set. 2006. Seção 1, p.1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46 de 24 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 out. 2007. Seção 1, p. 4.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 53 de 07 de outubro de 2014. Dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 194, 08 out. 2014. Seção 1, p. 118.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Indicadores IBGE:** Estatística da produção pecuária. Março de 2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201504_publ_completa.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2016.

BROWN-ESTERS, O.; NAMARA, P. M. C; SAVAIANO, D. Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 98-103, 2012.

BUZINARO, E. F.; ALMEIDA, R. A.; MAZEDO, G. M. F. S. Biodisponibilidade de cálcio dietético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n. 5, p. 852-861, 2006.

CANDIDO, L. M. B.; KRUGER, C. C. H. Proteínas do soro de leite bovino. Composição, propriedades nutritivas e funcionais tecnológicas, aplicações. In: **Inovação nos processos de obtenção, purificação e aplicação de components do leite bovino**. São Paulo: Editora Atheneu, 2012. 121-154.

CASTRO, L. C. G. O sistema endócrino vitamina D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 55, n. 8, p. 566-575, 2011.

CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D: beyond bone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 12871, n. 1, p. 45-58, 2013.

DI RIENZO, T. et al. Lactose intolerance: from diagnosis to correct management. **European Review Medical Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 2, p. 18-25, 2013.

EL-SAYED, M. M. H.; CHASE, H. A. Trends in whey protein fractionation. **Biotechnology letters**, v.33, n. 8, p. 1501-1511, 2011.

ENATTAH, N. S. et al. Identification of a variant associated with adult type hypolactasia. **Nature Genetics**, v. 30, p.233-237, 2002.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Codex Standard for fermented milks:** codex stan 243-2003. 2 ed. Roma, 2011.

FLEET, J. C.; SCHOCH, R. D. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 47, n. 4, p. 181–195, 2010.

FRIEDRICH, D. C. et al. Several different lactase persistence associated alleles and high diversity of the lactase gene in the admixed brazilian population. **Plos One**, v. 7, n. 9, 2012.

GANZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v.18, n. 7, p. 685– 694, 2008.

GUZMAN-GONZALES, M. et al. Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. I: Use of whey

protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n.2, p.1117–1122, 1999.

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 1, p.104-109, 2012.

HARPER, W. J.; SHIBERLING, D. A. General processing for manufactured products. In: **Dairy technology and engineering**. Connecticut: AVI Publishing Company, 1976. 185-212.

HAUG, A.; HOSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition. **Lipids in Health Disease**, v. 6, p. 1-16, 2007.

HEYMAN, M. B. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. **Journal of Pediatrics**, v. 118, n. 3, p. 1278-1287, 2006.

HEANEY, R. P. Dairy intake, dietary adequacy, and lactose intolerance. **Advances in Nutrition**, v. 4, p. 151-156, 2013.

HOLICK, M. Vitamin D deficiency. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 3, p. 266-281, 2007.

HOLICK, M. Vitamin D: a D-lightful health perspective. **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 2, p. 182-194, 2008.

HULMI, J. J.; LOCKWOOD, C. M.; STOUT, J. R. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. **Nutrition and Metabolism**, v. 7, n. 51, p. 2-11, 2010.

KULL, M.; KALLIKORM, R.; LEMBER, M. Impact of molecularly defined hypolactasia, self-perceived milk intolerance and milk consumption on bone mineral density in a population sample in Northern Europe. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 44, p. 415-421, 2009.

KWAK, H. S.; LEE, W. J.; LEE, M. R. Revisiting lactose as an enhancer of calcium absorption. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 147-151, 2012.

LEHTIMÄKI, T. et al. The effects of adult-type hypolactasia on body height growth and dietary calcium intake from childhood into young adulthood: a 21-year follow-up study--the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **Pediatrics**, v. 118, n. 4, p. 1553–9, 2006.

LEVITT, M.; WILT, T.; SHAUKAT, A. Clinical Implications of Lactose Malabsorption versus Lactose Intolerance. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 47, n. 6, p. 471-480, 2013.

LEWIS, M. The measurement and significance of ionic calcium in milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 1, p. 1-13, 2011.

LI, X. E. et al. Sugar reduction of skim chocolate milk and viability of alternative sweetening through lactose hydrolysis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1455-1466, 2015.

MADRY, E. et al. Lactose malabsorption is a risk factor for decreased bone mineral density in pancreatic insufficient cystic fibrosis patients. **European journal human genetics**, v. 20, n. 10, p. 1092–1095, 2012.

MATTHEWS, S. B. et al. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. **Postgraduate Medical Journal**, v. 81, p. 167-173, 2005.

MATTAR, R. et al. Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. **Nutrition Journal**, v. 46, n.8, p. 1-3, 2009.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 230-236, 2010.

MUEHLHOFF, E.; BENNETT, A.; MCMAHON, D. **Food and agriculture organization of the united nations (FAO): Milk and dairy products in human nutrition**. Rome, 2013.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos**. Tradução Fátima Murad. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PANDEY, K. R.; NAIK, S. R.; VAKIL, V. B. Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7577-7587, 2015.

PATEL, S. Emerging trends in nutraceutical applications of whey protein and its derivatives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 11, p. 6847-6858, 2015.

PEREIRA, G. A. P.; GENARO, P. S.; PINHEIRO, M. M.; SZEJNFELD, V. L.; MARTINI, L. A. Cálcio dietético – estratégias para otimizar o consumo. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 2, p. 164-180, 2009.

PEREIRA, P. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 619–627, 2014.

QIANG, X.; YONGLIE, C.; QIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrates Polymers**, v. 77, n. 3, p. 435-441, 2009.

RAHIMI-YAZDI, S.; FERRER, M. A.; CORREDIG, M. Nonsuppressed ion chromatographic determination of total calcium in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 5, 1788-1793, 2010.

RIDEFELT, P.; HAKANSSON, L. D. Lactose intolerance: Lactose tolerance test versus genotyping. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 40, p. 822-826,

2005.

ROBERFROID, M. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. 1-63, 2010.

SABATER-MOLINA, M. et al. Dietary fructooligosaccharides and potencial benefits on health. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 315-328, 2009.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Ed. Varela, 1996.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 387-409, out./dez., 2004.

SHAUKAT, A. et al. Systematic Review: Effective Management Strategies for Lactose Intolerance. **Annals of Internal Medicine**, v. 152, p. 797-803, 2010.

SOUZA, R. R. et al. Recovery and purification of lactose from whey. **Chemical Engineering and Processing**, v. 49, n. 11, p. 1137-1143, 2010.

SUCHY, F. J. et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference: lactose intolerance and health. **Annals of Internal Medicine**, v. 152, p. 792-796, 2010.

SUPERMERCADO MODERNO. **Perecíveis: lácteos resfriados**. Disponível em: <http://www.sm.com.br/portal/Principal/arquivos/Revista/193/upload/SM_201605_lowres_final.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2016.

TEIXEIRA, C. O. **Efluentes de laticínios, enquadramento legal e a representação dos técnicos e gerentes**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

TOMAR, B. S. Lactose Intolerance and Other Disaccharidase Deficiency. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 81, n. 9, p. 876-880, 2014.

UNITED STATES OF AMERICA - USA. Food and Drug Administration. **Code of Federal Regulations Title 21**: Direct food substances affirmed as generally recognized as safe. 29 fev. 1996 e 4 dez. 1984. Seção 184.1387 e 184.1388.

YEE, W. K.; WILEY, D. E.; BAO, J. Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: operability under constant operating conditions. **Journal of Membrane Science**, v. 290, p. 125-137, 2007.

ARTIGO

Efeitos da aplicação de concentrado proteico de soro de leite isento de lactose sobre os aspectos nutricionais e reológicos de iogurtes gregos

Ágatha Transfeld da Silva^{a,*}, Jair Lima^a, Priscila Reis^b, Maurício Passos^c, Catiucia Giraldi Baumgartner^d, Cláudia Carneiro Hecke Krüger^a, Lys Mary Bileski Cândido^b

Resumo

O objetivo deste estudo foi desenvolver formulações de iogurte grego prebiótico isento de lactose, adicionado de concentrado proteico de soro de leite, cálcio e rico em vitamina D destinado ao consumo por pessoas intolerantes à lactose. As faixas ótimas de concentração de enzima (0,23 a 0,30%) e tempo de reação (125 min a 150 min) promoveram grau de hidrólise da lactose de 100%. A aplicação do concentrado proteico de soro de leite isento de lactose promoveu os atributos viscosidade, firmeza e elasticidade, além de reduzir a sinérese e, ainda, incrementar o aporte proteico e de cálcio dos iogurtes. As três formulações analisadas na avaliação sensorial obtiveram médias de aceitabilidade geral entre o ponto 6 (gostei moderadamente) e o ponto 7 (gostei ligeiramente). Os resultados obtidos evidenciaram que a aplicação, em iogurtes, de concentrado proteico de soro de leite isento de lactose pode ser considerada uma prática com grande potencial.

Palavras-chave: Concentrado proteico de soro de leite; lactose; hidrólise enzimática; iogurte.

1. Introdução

O leite e seus derivados são produtos amplamente consumidos por serem de fácil acesso e, ainda, considerados alimentos com excelentes fontes de nutrientes. No entanto, os mesmos vêm sendo objetos de restrições no cotidiano alimentar, sobretudo, em função da má-absorção de lactose, principal açúcar presente nestes produtos (Muehlhoff, Benett, McMahon, 2013).

A prevalência da má-absorção da lactose na população mundial é de aproximadamente 70% (Muehlhoff, Benett, McMahon, 2013). Devido a variações genéticas ocorridas em algumas populações, a produção de lactase é programada para decrescer com o decorrer do tempo. Asiáticos, sul-africanos e americanos nativos do sul apresentam as maiores prevalências de produção reduzida de lactase. Populações pertencentes à Europa Central e do Norte apresentam prevalências extremamente baixas, havendo o favorecimento de produção contínua de lactase para a grande maioria destes (Enattah, Sahi, Savilahti, Terwilliger, Peltonen, Jarvela, 2002).

No Brasil, a prevalência de deficiência da enzima lactase é de, aproximadamente, 56% em brancos e morenos, 80% em negros e 100% em japoneses (Mattar, Monteiro, Villares, Santos, Silva, Carrilho, 2009). O estudo conduzido por Friedrich, Santos, Ribeiro-dos-Santos & Hutz (2012), identificou que 48,6% das pessoas avaliadas pertencentes à região Sul do Brasil com ancestralidade europeia apresentaram genes associados à não persistência da enzima lactase; as pessoas avaliadas nesta mesma região com ascendência africana apresentaram a frequência de 68,1%. No Norte este valor foi igual a 69% e no Nordeste do Brasil 63,4%.

A diminuição ou isenção no consumo de leite e seus derivados devido à má-absorção da lactose faz com que o acesso a alimentos processados que atendam às necessidades desta restrição alimentar - produtos lácteos com teores reduzidos/isentos de lactose - venham a contribuir, complementando a alimentação de uma parcela significativa da população (Haug, Hostmark, Harstad, 2007).

Em relação às versões de lácteos resfriados no volume de vendas brasileiras, os iogurtes com polpas de frutas participam em 25,2%, seguidos por iogurtes líquidos embalagem familiar (24,9%), leites fermentados (9,8%), iogurtes líquidos individuais (8,5%), iogurtes funcionais (7,3%), iogurtes naturais (6,4%), iogurtes concentrados (6%), iogurtes petit suisse (5,3%), iogurtes *diet/light* (3,1%), sobremesas (2,6%), iogurtes sem lactose (0,9%) (Supermercado Moderno, 2016). Devido a esta demanda e ao consumo ascendente de iogurtes concentrados denominados como gregos, cabe então, valorizar este produto nos quesitos nutricional e reológico, de modo que o mesmo possa ser consumido por intolerantes à lactose.

Iogurtes gregos são produtos fermentados que se apresentam no estado semi-sólido a sólido, com concentração de sólidos totais superior e, conseqüentemente, umidade inferior aos demais iogurtes. O processo de elaboração deste tipo de iogurte consiste basicamente na concentração da gordura e eliminação do soro do leite (Nsabimana, Jiang, Kossah, 2005). No Brasil, este tipo específico de iogurte não possui regulamentação prevista em lei.

A adição, em produtos lácteos, de vitamina D, vitamina encontrada naturalmente em concentrações satisfatórias em limitados alimentos, como peixes e seus óleos, e de frutooligossacarídeo, fibra alimentar solúvel, possuem a capacidade de aumentar a absorção do mineral cálcio, além de promover ações relacionadas ao

sistema imunorregulatório e controle lipídico, respectivamente (Pereira, Genaro, Pinheiro, Szeinfeld, Martini, 2009).

Ainda com o intuito de incrementar a composição nutricional e, especialmente, de proporcionar melhorias no aspecto sensorial de alimentos, a adição de concentrado proteico de soro de leite (CPS), produto obtido por meio do soro, considerado um sub-produto da indústria de laticínios, pode aumentar o aporte proteico e, ainda, promover os atributos relacionados à viscosidade e textura quando adicionado a outros alimentos (Teixeira, 2011; Cândido, Kruger, 2012).

Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi comparar a eficiência de duas enzimas comerciais de fornecedores diferentes na hidrólise da lactose do concentrado proteico de soro de leite, estabelecendo as condições experimentais a fim de promover a completa hidrólise da lactose deste produto e, ainda, desenvolver iogurtes gregos isentos de lactose, adicionados de concentrado proteico de soro de leite isento de lactose, leite em pó isento de lactose, cálcio, vitamina D e frutooligossacarídeo, destinados ao consumo por pessoas intolerantes à lactose.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

O concentrado proteico de soro de leite foi fornecido pela empresa Sooro[®] localizada em Marechal Cândido Rondon (Paraná, Brasil). As enzimas Lactozym Pure 6500L e Maxilact LGX 5000, foram fornecidas pelas empresas Novozymes[®] (Paraná, Brasil) e DSM Globalfood[®] (São Paulo, Brasil), respectivamente. O leite semi-desnatado pasteurizado utilizado na formulação do iogurte foi adquirido por meio de entrega direta ao laboratório pela empresa Qualitat[®] situada em Witmarsum

(Paraná, Brasil). O leite em pó integral Ninho Forti+ Zero lactose[®] e a vitamina D₃ líquida (Power Vita[®]) foram adquiridos no comércio local. A cultura láctica selecionada foi fornecida pela empresa Frimesa[®] de Marechal Cândido Rondon (Paraná, Brasil), sendo composta pelas bactérias lácticas *Streptococcus salivarius subs. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (Yomix 499 LYO 250 DCU – Danisco[®]). O FOS foi cedido pela empresa Ingredion[®] situada em Balsa Nova (Paraná, Brasil). O estabilizante/espessante Doremix BL H, composto por gelatina e goma guar, foi cedido pela empresa Doremus[®] situada em Guarulhos (São Paulo, Brasil).

Todos os reagentes possuíam grau analítico. Os padrões de lactose, glicose, galactose, ácido láctico, frutose e carbonato de cálcio foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (São Paulo, Brasil).

2.2. Caracterização físico-química

O pH das amostras foi mensurado através do método potenciométrico (Instituto Adolfo Lutz, 2008), com uso de pHmetro modelo mPA210 marca Ms Tecnopon Instrumentação[®] (São Paulo, Brasil). A determinação de gordura das amostras foi realizada conforme método Roese-Gottlieb 905.02 (AOAC, 2000). A concentração de proteína foi realizada pelo método de Kjeldahl (991.20) com uso de digestor (modelo DK20), recirculador de água (modelo JP), purificador (modelo SMS) e destilador (modelo UDK 139) da marca Velp Scientifica[®] (Bohemia, Estados Unidos) (AOAC, 2000). O concentrado proteico de soro de leite e os iogurtes tiveram suas concentrações de cálcio determinadas por meio de espectrometria de absorção atômica seguindo o método 991.25 (AOAC, 2000). A determinação de cinzas do

concentrado proteico de soro de leite foi realizada conforme método gravimétrico (930.30) (AOAC, 2000). A umidade do concentrado proteico de soro de leite foi realizada conforme método 927.05 (AOAC, 2000).

As determinações de cinzas dos iogurtes foram realizadas conforme método 945.46 (AOAC, 2000). As análises de umidade e sólidos totais dos iogurtes foram realizadas conforme método 990.20 (AOAC, 2000). As análises de fibras alimentares totais dos iogurtes foram realizadas de acordo com método 991.43 (AOAC, 2000). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.2.1. Quantificação dos açúcares e ácido láctico

Para determinação, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), dos açúcares (lactose, glicose, galactose) e de ácido láctico presentes nas amostras de concentrado proteico de soro de leite, leite pasteurizado semi-desnatado, leite em pó e dos iogurtes, foi realizada primeiramente a desproteínização das amostras de acordo com Essig & Kleyn (1983), com algumas adaptações. Foram utilizadas alíquotas de 4 g das amostras, às quais foram adicionados 4 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15% e 4 mL da solução de sulfato de zinco a 30%. Após agitação e repouso por cinco minutos, o volume foi completado até 50 mL com água destilada. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 480 x g por 10 min. A amostra de CPS foi ainda filtrada através de filtro de seringa em PVDF de 0,45 µm da marca Millipore® (Darmstadt, Alemanha) antes da análise cromatográfica.

Utilizou-se Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência equipado com injetor automático da marca Varian ProStar® modelo 410 (Vitória, Austrália), bomba ternária (Varian, ProStar, modelo 230) e com detector de índice de refração (Varian,

ProStar, modelo 350) com célula eletroquímica de detecção a 40°C.

A análise cromatográfica do CPS, leite semi-desnatado pasteurizado, leite em pó e dos iogurtes foi realizada com utilização de forno de coluna da marca Young Lin Instrument (Gyeonggi, Coréia do Sul) a 55°C com uso sequencial das colunas Rezex ROA (30 cm x 7,5 cm) da marca Phenomenex® (Torrance, Estados Unidos) e da coluna Supelcogel C-610H (30 cm x 7,8 mm) da marca Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil). O fluxo foi de 0,5 mL por minuto, o volume de injeção igual a 20 µL e fase móvel composta de água ultra pura e ácido sulfúrico 8 mM (Sigma-Aldrich, 2014).

A análise de frutose presente no FOS foi realizada com a coluna Supelcogel C-610H (30 cm x 7,8 mm) da marca Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil) em temperatura ambiente. O fluxo foi de 0,5 mL por minuto, o volume de injeção igual a 20 µL e fase móvel composta de água ultra pura e ácido sulfúrico 8 mM (Sigma-Aldrich, 2014).

Os picos foram identificados por comparação com o tempo de corrida de padrões de açúcares e ácido láctico e para a quantificação, em triplicata, aplicou-se o método do padrão externo, utilizando curvas de calibração com cinco pontos na faixa de concentração compreendida entre 0,01 g.100g⁻¹ a 0,45 g.100g⁻¹.

2.3. Planejamento experimental

Para o planejamento experimental aplicado à hidrólise da lactose presente no concentrado proteico de soro de leite foram utilizadas duas enzimas β-galactosidasas, uma comercialmente denominada Maxilact LGX 5000 (DSM Globalfood®) com atividade declarada de ≥ 5000 NLU/g, e a outra, Lactozym Pure

6500 L (Novozymes®), com atividade declarada de ≥ 6500 NLU/g, sendo as duas provenientes da levedura *Kluyveromyces lactis*. Este processo foi realizado à temperatura de 37°C e o pH foi mantido na faixa de 6 a 7.

As enzimas foram aplicadas em diferentes níveis de concentração (0,15 a 0,30%) e tempo (101,71 a 158,28 min). Desta forma, a resposta percentual de hidrólise foi estudada por meio das seguintes variáveis independentes: concentração de enzima (x_1) e tempo (x_2).

Foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), num esquema fatorial completo 2^2 , incluindo quatro pontos axiais e três pontos centrais para avaliação do erro puro, totalizando onze ensaios.

Para cada ensaio foram utilizados 10 mL de uma solução de CPS a 20% e concentrações variáveis de enzima. Todos os experimentos foram realizados em condições ambientais controladas, utilizando uma câmara de fluxo laminar vertical da marca Labconco® classe II tipo B2 (Kansas, Estados Unidos). Ao término de cada ensaio foram retiradas alíquotas para contagem de micro-organismos mesófilos.

Para determinação do grau de hidrólise, a fim de inativar completamente a atividade enzimática, após cada tempo específico, as amostras foram colocadas em banho de água a 95°C por três minutos (Victor, Pavel, 1985).

Para o planejamento experimental aplicado ao desenvolvimento dos iogurtes, adicionou-se ao leite semi-desnatado isento de lactose: carbonato de cálcio ($375 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$), vitamina D₃ ($2 \text{ } \mu\text{g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$), FOS ($3 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$), espessante/estabilizante ($0,6 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$). As concentrações de cálcio, vitamina D e FOS foram definidas baseando-se na ingestão diária recomendada (IDR) para adultos de cada uma destas substâncias (Brasil, 2005). O leite semi-desnatado pasteurizado teve sua lactose totalmente hidrolisada utilizando 0,20% da enzima

Lactozym Pure 6500 L por 120 min a 37°C. Esta condição foi definida por meio de estudos preliminares (Moreira, Kruger, Silva, Passos, Candido, 2015).

Os iogurtes foram desenvolvidos com aplicação de diferentes níveis de concentração de concentrado proteico de soro de leite isento de lactose (CPSIL) (2,58 a 5,41%) e concentração de leite em pó isento de lactose (LPIL) (2,58 a 5,41%). As respostas viscosidade, sinérese, firmeza e elasticidade foram estudadas por meio das seguintes variáveis independentes: concentração de concentrado proteico de soro de leite isento de lactose (x_1) e concentração de leite em pó isento de lactose (x_2).

Foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), num esquema fatorial completo 2^2 , incluindo quatro pontos axiais e dois pontos centrais para avaliação do erro puro, totalizando dez ensaios.

Não foram adicionados conservantes, adoçantes, açúcares, aromas e corantes. A mistura final foi aquecida a 70°C por 30 minutos e acondicionada em recipientes plásticos de 145 mL.

Ao resfriarem a $42,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, inoculou-se 1 g de cultura láctea para cada 1000 mL de leite utilizado nas formulações. As amostras foram mantidas nesta temperatura até atingir a faixa de pH entre $4,55 \pm 0,05$, em seguida, foram resfriadas e mantidas a $5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h, para avaliação de firmeza e elasticidade, e 48 h para determinação da viscosidade e sinérese.

Foi desenvolvido, juntamente com os demais, um iogurte controle contendo apenas leite semi-desnatado pasteurizado isento de lactose, espessante/estabilizante e cultura láctica nas mesmas concentrações dos outros iogurtes produzidos.

A Tabela 1 apresenta as variáveis codificadas e com seus respectivos níveis de variação para hidrólise do CPS utilizado no estudo e para as formulações dos iogurtes.

Tabela 1- Variáveis codificadas e com níveis de variação para a hidrólise do concentrado proteico de soro de leite e para as formulações dos iogurtes

Ensaio	x_1	x_2	Concentração enzima (%)	Tempo (min.)	Concentração CPSIL (%)	Concentração LPIL (%)
1	-1	-1	0,180000	110,0000	3	3
2	-1	1	0,180000	150,0000	3	5
3	1	-1	0,280000	110,0000	5	3
4	1	1	0,280000	150,0000	5	5
5	-1,414	0	0,159289	130,0000	2,585786	4
6	1,414	0	0,300711	130,0000	5,414214	4
7	0	-1,414	0,230000	101,7157	4	2,585786
8	0	1,414	0,230000	158,2843	4	5,414214
9	0	0	0,230000	130,0000	4	4
10	0	0	0,230000	130,0000	4	4
11	0	0	0,230000	130,0000	-	-

Variáveis codificadas de concentração de enzima (x_1) e tempo (x_2) / (x_1) CPSIL: concentrado proteico de soro de leite isento de lactose e (x_2) LPIL: leite em pó isento de lactose.

Após avaliação dos resultados obtidos, foram selecionados três tratamentos para realização de avaliação da aceitação dos produtos por meio de teste sensorial com escala hedônica.

2.4. Viscosidade, sinérese, firmeza e elasticidade

A viscosidade dos iogurtes foi determinada a temperatura de 25°C utilizando viscosímetro Brookfield® modelo LVDV II+ (Massachusetts, Estados Unidos) e um adaptador para pequenas amostras (spiral adapter S70), velocidade 100 rpm. A leitura foi registrada após 30 segundos de análise (Brookfield, 2016).

Para medir a sinérese dos iogurtes foi utilizado o método descrito por Riener, Noci, Cronin, Morgan, Lyng (2010), com adaptações. Foram pesados 30 g de cada amostra de iogurte, espalhados uniformemente em papel filtro Whatman[®] n° 1 (São Paulo, Brasil), os quais foram colocados em funis e dispostos no topo de cilindros graduados. Os conjuntos foram colocados a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante cinco h. O soro expelido foi coletado e o volume registrado.

A análise do perfil de textura dos iogurtes, mais especificamente das características firmeza e elasticidade, foi realizada conforme Sandoval-Castilla, Lobato-Calleros, Aguirre-Mandujano e Vernon-Carter (2004) com algumas adaptações. As características de textura dos iogurtes foram obtidas através de texturômetro da marca Brookfield[®] modelo CT3 (Massachusetts, Estados Unidos). Os experimentos foram realizados por meio de testes de compressão: probe cilíndrico (TA4/1000) de 38,1 mm de diâmetro (distância: 10 mm, velocidade de ensaio: 1 mm s^{-1} , força de compressão: 4 g).

2.5. Análise sensorial

Os iogurtes foram avaliados por uma equipe composta de 115 provadores não treinados (Dutcosky, 2011). Os provadores receberam as amostras em recipientes codificados com números aleatórios de dois e três dígitos, acompanhadas de água. Foi aplicado o teste de aceitação geral dos iogurtes utilizando escala hedônica de nove pontos (gostei muitíssimo= 9, gostei muito = 8, gostei moderadamente = 7, gostei ligeiramente = 6, indiferente = 5, desgostei ligeiramente= 4, desgostei moderadamente = 3, desgostei muito = 2, desgostei muitíssimo = 1).

A análise foi realizada em cabines individuais computadorizadas, sob condições de iluminação controlada e utilizando o programa Fizz Sensory Software 2.47B (Biosystèmes, Couternon, FR).

Atendendo aos aspectos éticos, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) sob o CAAE nº 39499414.6.0000.5547. A participação dos provadores ocorreu mediante o aceite do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3. Análise microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas seguindo os métodos recomendados pela American Public Health Association (APHA, 2000).

As amostras de iogurte foram mantidas refrigeradas ($5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) até o momento da análise microbiológica, que ocorreu 48 h após a produção dos mesmos.

A pesquisa de mesófilos foi realizada por meio de plaqueamento de profundidade (pour plate) em ágar padrão para contagem (PCA) a 35°C por 48 h. O resultado foi expresso em UFC/g.

A contagem de bolores e leveduras foi executada por meio da incubação da amostra em ágar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) a 25°C por 5 dias. O resultado foi expresso em UFC/g.

Para a análise de coliformes totais e termotolerantes, as amostras foram incubadas a 35°C por 48 h em caldo lauril sulfato triptose (LST). As amostras que apresentaram formação de gás, foram transferidas ao caldo *E. coli* (EC) a 45°C por

24 h e caldo verde brilhante bile (VB) a 35°C por 48 h. Os resultados foram expressos em NMP/g.

Para a análise de *Staphylococcus aureus*, as amostras foram incubadas em caldo tripticase de soja (TSB) a 35°C por 48 h. A partir de cada tubo com crescimento, foi estriada (estrias de esgotamento) uma cultura em placa ágar Baird-Parker (BP) a 35°C por 48 h. Na presença de colônias típicas, estas foram submetidas à confirmação em caldo infusão cérebro coração (BHI) a 35°C por 24 h e uma alçada foi transferida para o ágar tripticase de soja (TSA) a 35°C por 24 h. O teste sequencial de coagulase permitiu identificar o NMP/g do microrganismo em questão.

Para a contagem de bactérias lácticas, as amostras foram incubadas em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) a 35°C por 4 dias. Os resultados foram expressos em UFC/g.

A pesquisa de *Salmonella* sp foi realizada por meio de incubação das amostras em caldo Rappaport-Vassilidis Soja (RVS) a 41°C por 24 h, com posterior plaqueamento em ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) a 37°C por 24 h. Os resultados foram expressos em ausência/presença em 25 g.

Para análise de *Bacillus cereus*, as amostras foram encaminhadas para um laboratório especializado em análises microbiológicas de alimentos, sendo que, o mesmo também utilizava as normas preconizadas pela APHA.

4. Análise estatística

Os delineamentos experimentais com aplicação da metodologia de Superfície de Resposta foram desenvolvidos com o auxílio do programa Statistica versão 7 (StatSoft) (Tulsa, Estados Unidos).

Os dados relacionados à caracterização dos produtos e à comparação dos resultados obtidos foram avaliados utilizando-se o programa SPSS Statistics versão 22 (Chicago, Estados Unidos). Foi verificada a distribuição dos dados e aplicado o teste T de Student, como também, Análise da Variância (ANOVA) utilizando teste post hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

5. Resultados e discussão

5.1. Delineamento experimental e otimização do processo de hidrólise do CPS

O concentrado proteico de soro de leite utilizado para a realização do delineamento experimental e otimização do processo de hidrólise continha em sua composição inicial ($\text{g. } 100 \text{ g}^{-1}$): $22,96 \pm 0,07$ lactose, $0,62 \pm 0,01$ glicose, $0,69 \pm 0,02$ galactose, $0,67 \pm 0,00$ ácido láctico, $5,50 \pm 0,00$ gordura, $60,07 \pm 0,08$ proteína, $5,64 \pm 0,40$ umidade, $3,94 \pm 0,03$ cinzas, e pH $6,05 \pm 0,01$. Pode-se verificar a alta concentração de proteínas, assim como, de lactose que o produto apresenta naturalmente, sendo que, a quantidade deste dissacarídeo no CPS foi, aproximadamente, quatro vezes superior a do soro de leite (Fig. 1).

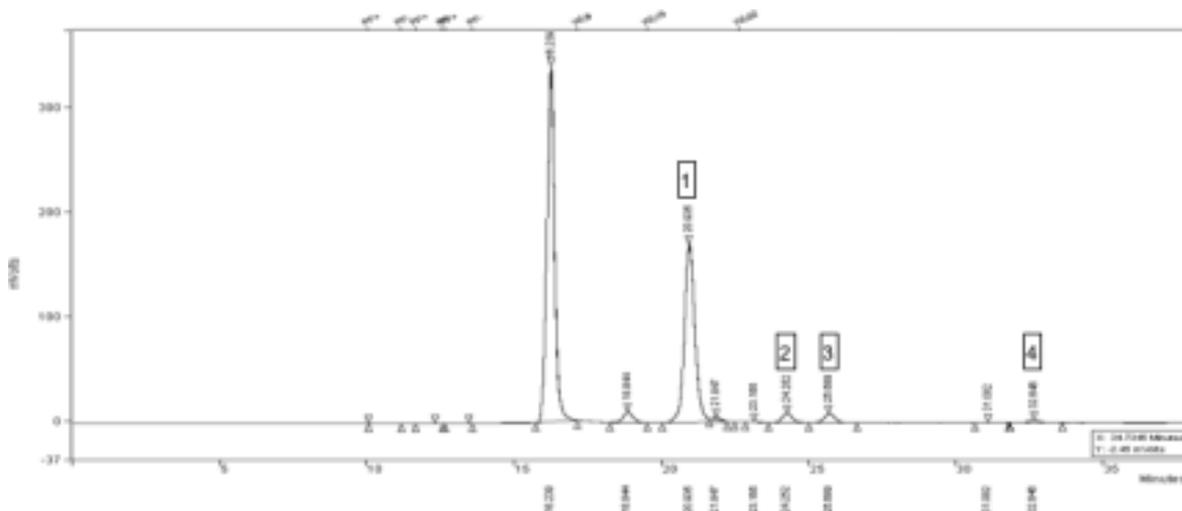


Fig. 1 - Cromatograma da amostra inicial de concentrado proteico de soro de leite. Pico 1 – lactose, pico 2 – glicose, pico 3 – galactose, pico 4 – ácido láctico. Os resultados representam a média de três determinações.

Os dados da Análise de Variância (ANOVA) obtidos a partir do experimento realizado com a enzima Lactozym Pure 6500 L, permitem concluir que os efeitos de tempo e concentração de enzima em termos lineares e quadráticos, bem como sua interação, foram significativos ($p < 0,05$). O valor do percentual de variação (R^2) obtido foi de 0,98316, indicando que 98% da variabilidade na resposta podem ser explicadas pelo modelo utilizado. A equação 1 (Eq. 1), obtida por meio dos coeficientes resultantes da análise de regressão múltipla, representa o modelo para o percentual de hidrólise em função das variáveis estudadas.

$$\begin{aligned} \text{Hidrólise Lactozym Pure 6500 L (\%)} = & 83,6020 + 54,6234x_1 - 73,0950x_2^2 \\ & + 0,1421x_2 - 0,0004x_2^2 - 0,1035x_1 \cdot x_2 \end{aligned} \quad (1)$$

onde x_1 = concentração de enzima (%); x_2 = tempo (min)

Quanto à enzima Maxilact LGX 5000, verifica-se que o modelo também pode ser utilizado para fins preditivos, uma vez que o mesmo apresentou um percentual de variação (R^2) igual a 0,92702. Neste caso, o efeito da interação entre as variáveis

independentes concentração de enzima e tempo não apresentou significância estatística ($p > 0,05$). Para ambas as enzimas, o valor significativo da análise do modelo de regressão também indicou o ajuste do modelo experimental adotado ($p < 0,05$). A equação 2 (Eq. 2) representa o modelo para o percentual de hidrólise em função das variáveis estudadas.

$$\begin{aligned} \text{Hidrólise Maxilact LGX 5000 (\%)} = & 71,483 + 98,796x_1 - 165,150x_1^2 + 0,240x_2 \\ & - 0,001x_2^2 \end{aligned} \quad (2)$$

onde x_1 = concentração de enzima (%); x_2 = tempo (min)

Com o objetivo de determinar a resposta máxima, isto é, a completa hidrólise da lactose presente no CPS, foram elaborados gráficos de superfície de resposta tridimensionais. As curvas de nível auxiliam na visualização de uma região ótima para a atividade enzimática, onde se encontra uma faixa de combinações de concentração de enzima e tempo (Fig. 2).

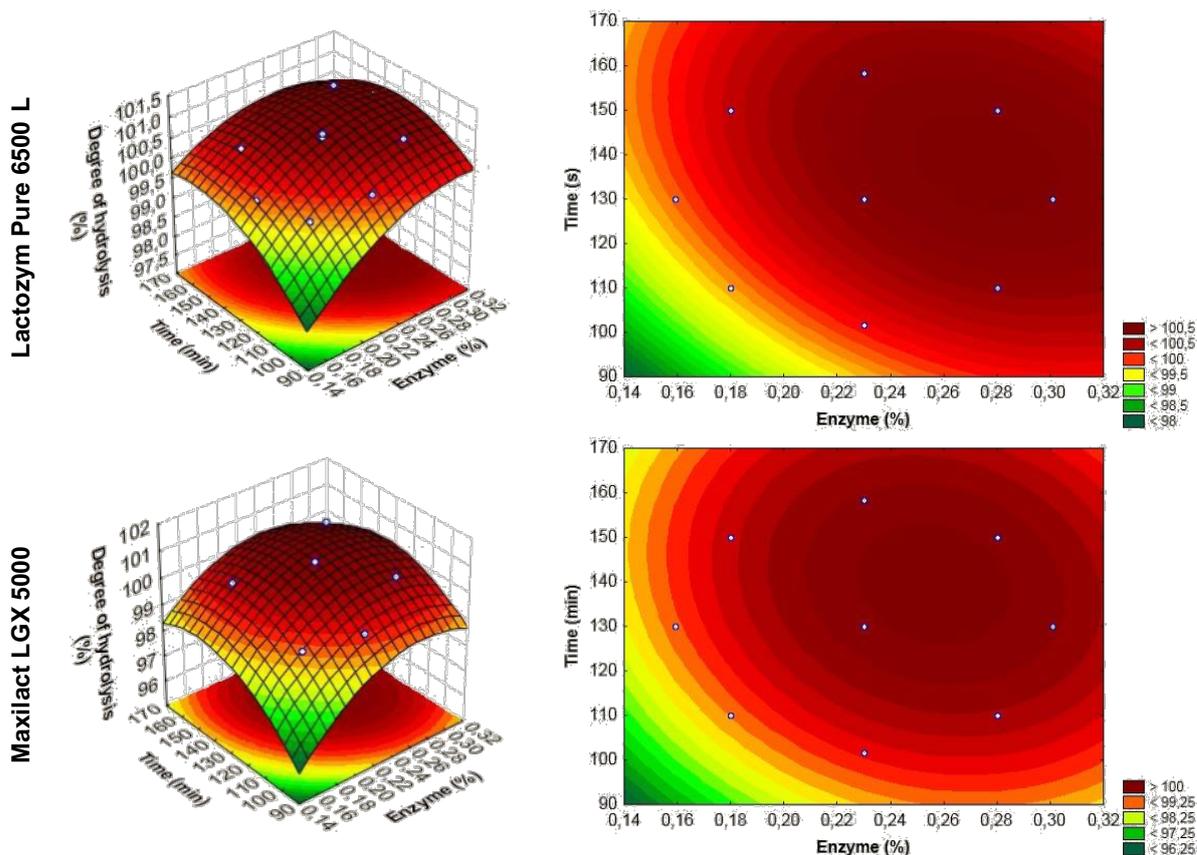


Fig. 2 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para o grau de hidrólise (%) com a enzima Lactozym Pure 6500 L e Maxilact LGX 5000 em função da concentração de enzima (%) e tempo (min)

Para a enzima Lactozym Pure 6500 L a variação de concentração de enzima na faixa ótima foi de 0,25 a 0,30% e tempo de 125 a 150 min. No que se refere à enzima Maxilact LGX 5000, a faixa de concentração de enzima na faixa ótima foi de 0,23 a 0,28% e tempo de 125 a 150 min. Estas faixas ótimas de concentração de enzima e tempo são de grande valia pois admite-se que valores que se encontram dentro destas variações ainda mantém o processo na região otimizada.

Os resultados alcançados a partir da otimização do processo de hidrólise do CPS foram confirmados pela realização, em triplicata, dos experimentos nas melhores condições definidas de concentração de enzima e tempo para cada enzima, obtendo-se um grau de hidrólise igual a $100,67 \pm 0,03$ (%) utilizando a enzima Lactozym Pure 6500 e $100,43 \pm 0,17$ (%) para a enzima Maxilact LGX 5000

(Fig. 3). Os graus de hidrólise resultantes dos diferentes valores de tempo (min) e concentração de enzima (%) aplicados para cada enzima não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$).

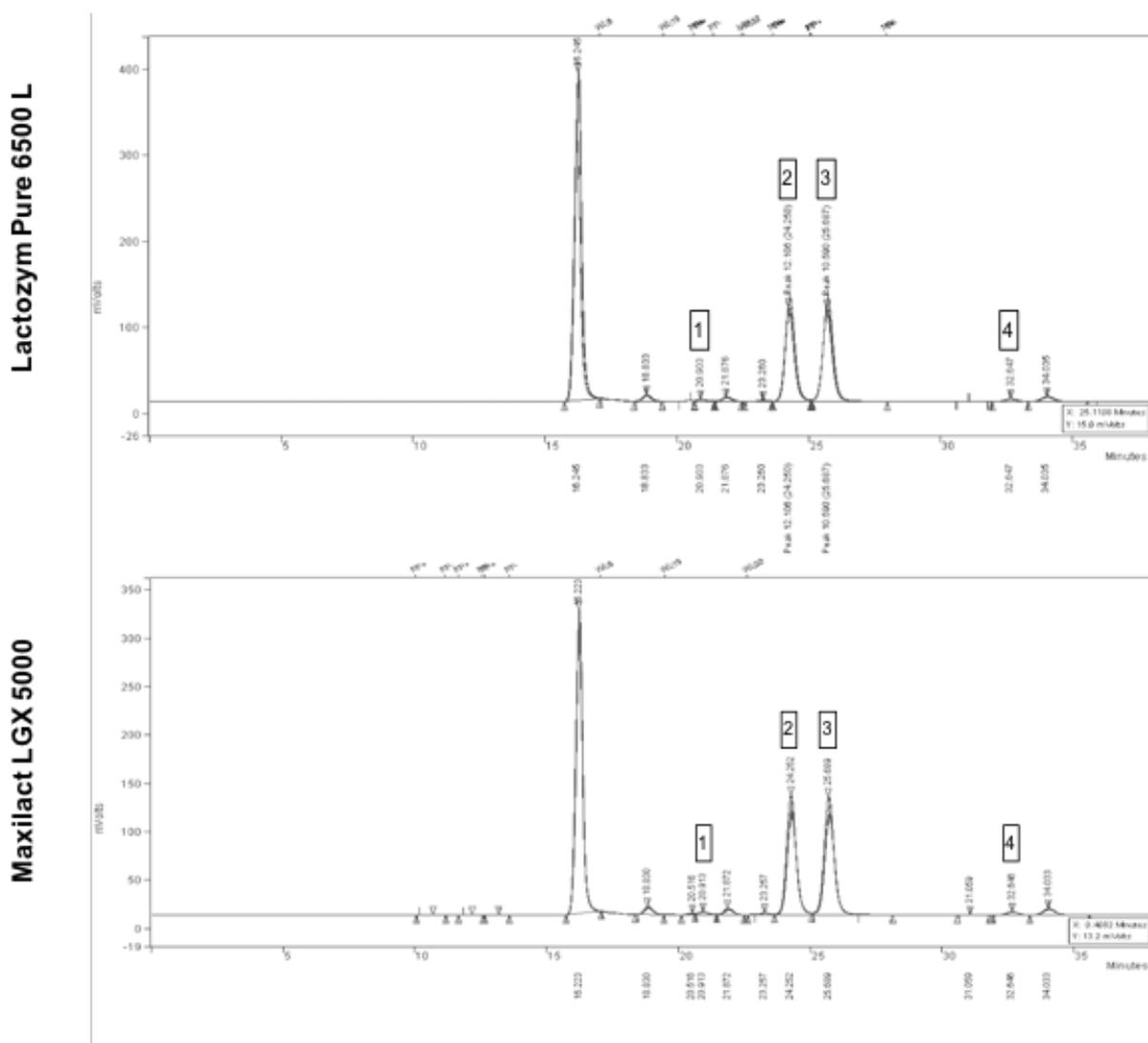


Fig. 3 - Cromatograma da amostra de concentrado proteico de soro de leite após validação experimental com a enzima Lactozym Pure 6500 L e Maxilact LGX 5000. Pico 1 – lactose, pico 2 – glicose, pico 3 – galactose, pico 4 – ácido láctico. Os resultados representam a média de três determinações.

Apesar de haverem trabalhos envolvendo a temática, percebe-se que a hidrólise completa da lactose é um resultado difícil de ser alcançado. Isto se deve a fatores que são inerentes ao processo de hidrólise enzimática, como por exemplo, limitações na transferência de massa, quando se trata de enzima imobilizada e

produção de galactose que desempenha um papel inibitório sobre a atividade da enzima (Husain, 2010).

Os resultados deste estudo foram diferentes dos obtidos por Vasileva, Ivanov, Damyanova, Kostova & Godjevargona (2016) que realizaram a hidrólise de soro de leite (4,7% de lactose) nas seguintes condições: temperatura de 30°C a 43°C e concentração de enzima 0,0045%. O maior grau de hidrólise obtido pelos autores foi igual a 47% após 12 h, aplicando-se a temperatura de 37°C. Conforme seus resultados, a temperatura ótima de atuação da enzima β -galactosidase livre é a utilizada pelo estudo, sendo esta a temperatura fixada para o processo de hidrólise da presente pesquisa.

Mesmo utilizando a enzima proveniente do micro-organismo *Kluyveromices lactis* e a temperatura de 37°C, porém, com uso da enzima de forma imobilizada, Klein et al. (2013) executaram a hidrólise do soro de leite em pó (5% de lactose) e obtiveram um grau de hidrólise de aproximadamente 90%.

Quando se trata de produtos lácteos fermentados, outra maneira de realizar a hidrólise da lactose é desenvolver este processo juntamente com a fermentação, visto que, a presença das bactérias lácticas pode contribuir com a redução de, aproximadamente, 30% da lactose presente (Harju, Kallioinen, Tossavainen, 2012). Desta forma, Vénica, Perotti & Bergamini (2014) em seu estudo, produziram iogurtes naturais e adoçados com sacarose, com adição de concentrado proteico de soro de leite (48,2% de lactose) na proporção de 1% e 2% e leite em pó desnatado (50% de lactose), na proporção de 1,13% e 2,25%. Após a hidrólise, utilizando a enzima lactase proveniente do micro-organismo *Kluyveromyces lactis* em concentração igual a 0,040% e temperatura de 42°C \pm 2°C, o valor residual de lactose obtido pelos

autores foi de $0,96 \pm 0,34$ (%) e $1,12 \pm 0,29$ (%), para os iogurtes naturais e adoçados, respectivamente.

Wolf, Vénica & Perotti (2015) também efetuaram a hidrólise enzimática da lactose juntamente com o processo de fermentação do leite para produção de iogurte. Adicionaram, também, um mix de leite em pó desnatado e concentrado proteico de soro de leite em uma proporção de 4,4%. Os autores utilizaram 0,025% da enzima β -galactosidase de *Kluyveromices lactis* a 42°C, após 150 minutos, o grau de hidrólise foi de 75% a 78%.

Com o objetivo de analisar a viabilidade, no quesito microbiológico, do processo de hidrólise, realizado a 37°C, ao término de cada ensaio do DCCR aplicado ao CPS, por meio da análise de micro-organismos mesófilos estáveis, verificou-se que todos os experimentos tiveram resultados inferiores a 36.10^3 (UFC/g⁻¹) o que está abaixo de 1.10^5 (UFC/g⁻¹), parâmetro exigido pela legislação vigente para leite em pó, visto que, produtos como concentrados e isolados proteicos de soro de leite não são abordados, de forma específica, pela legislação brasileira vigente (Brasil, 1997).

Nesta perspectiva, a fim de reduzir a possibilidade de contaminação microbiana, Klein et al. (2013) realizaram a hidrólise enzimática a temperatura de 37°C e 7°C. Mantendo as outras condições iguais, a diminuição da temperatura reduziu o grau de hidrólise de 90% para 72%. Segundo os autores, esta diferença pode ser explicada pela dificuldade na transferência de massa, causada pelas proteínas do soro, que se acentua em temperaturas de refrigeração.

Nenhum dos produtos obtidos nas pesquisas acima citadas poderiam possuir o atributo “não contém”, de acordo com a legislação brasileira vigente que consiste no Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar, pois

nestes, a concentração de lactose é superior a 0,5 g de lactose por 100 g ou porção (Brasil, 2012).

5.2. Delineamento experimental das formulações de iogurtes isentos de lactose

Os dados da Análise de Variância (ANOVA) obtidos a partir do experimento relacionado à viscosidade das formulações de iogurtes, permitem concluir que os efeitos de concentração de concentrado proteico de soro de leite isento de lactose e concentração de leite em pó isento de lactose em termos lineares, bem como sua interação, foram significativos ($p < 0,05$). O valor do percentual de variação (R^2) obtido foi de 0,94714, indicando que 94,7% da variabilidade na resposta podem ser explicadas pelo modelo utilizado (Eq. 3). Além disso, o valor significativo da análise do modelo de regressão múltipla indicou o ajuste do modelo experimental adotado ($p < 0,05$).

$$\text{Viscosidade (mPa.s)} = 869,8396 - 82,9702x_1 - 72,3534x_2 + 39,2900x_1x_2 \quad (3)$$

onde x_1 = concentração de CPSIL; x_2 = concentração de LPIL

Os valores calculados em função da concentração de CPSIL e concentração de LPIL para o atributo sinérese, permitem identificar que somente a variável CPSIL foi estatisticamente significativa em níveis lineares e quadráticos ($p < 0,05$). O valor de (R^2) obtido foi de 0,91144, indicando que 91% da variabilidade na resposta podem ser explicadas pelo modelo utilizado (Eq. 4). O valor significativo da análise do modelo de regressão múltipla indicou o ajuste do modelo experimental adotado ($p < 0,05$).

$$\text{Sinérese (\%)} = - 4,64023x_1 + 0,59375x_1^2 \quad (4)$$

onde x_1 = concentração de CPSIL

Os modelos aplicados em função da concentração de CPSIL e concentração de LPIL para os atributos firmeza e elasticidade apresentaram valores de R^2 iguais a 75% e 70%, respectivamente, além de falta de ajuste da modelagem ($p > 0,05$). Estes modelos não descrevem adequadamente a relação entre as variáveis independentes e a resposta. Uma mudança nas faixas de valores das variáveis estudadas pode ajustar os modelos.

Abaixo foram desenvolvidos gráficos de superfície de resposta tridimensionais. As curvas de nível auxiliam na visualização de uma região ótima para as respostas viscosidade e sinérese (Fig. 4):

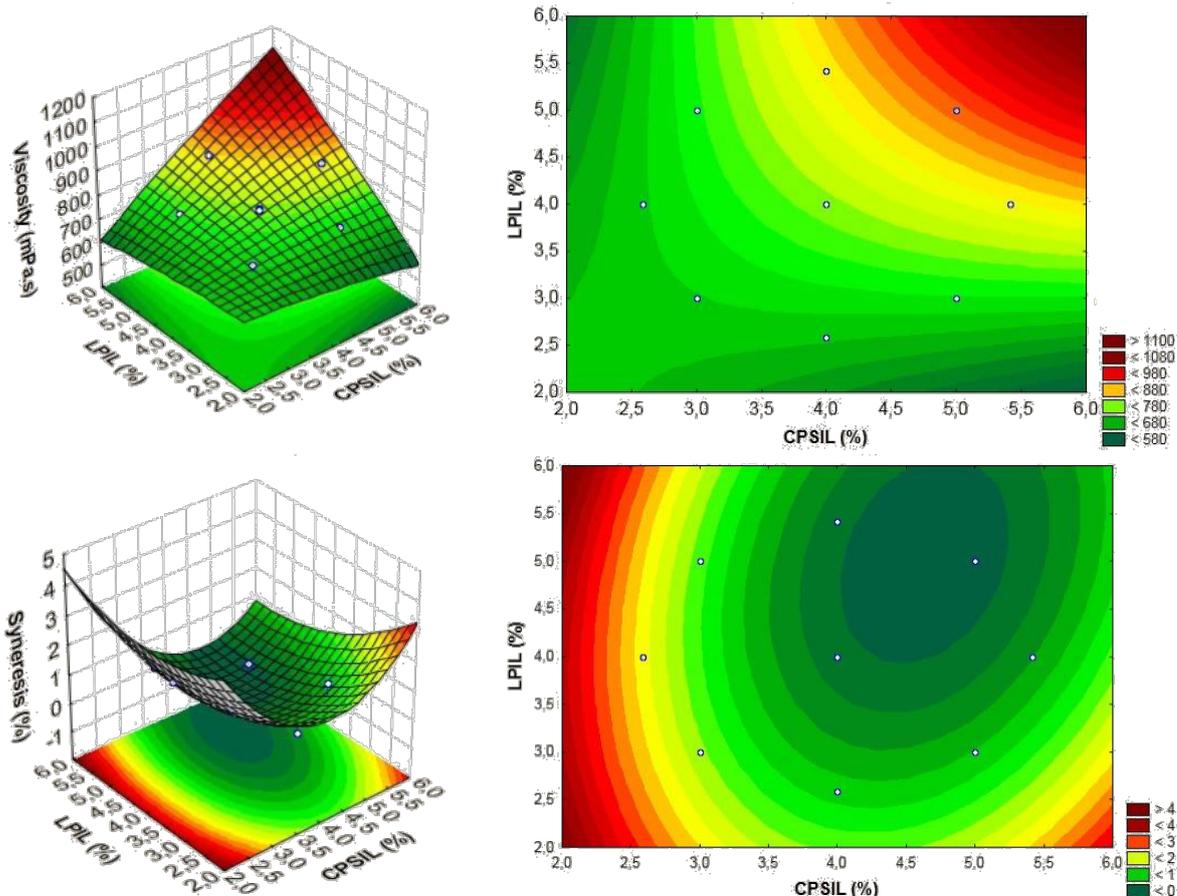


Fig. 4 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a viscosidade (mPa.s) e sinérese (%) em função da concentração de CPSIL (%) e LPIL (%)

Como se pode verificar, em concentrações mais elevadas de CPSIL e LPIL os valores de viscosidade dos iogurtes foram superiores aos verificados por iogurtes compostos com menores concentrações de CPSIL e LPIL (< 4%). Estas concentrações mais elevadas destes ingredientes nas composições dos iogurtes permitem também obter valores de sinérese inferiores aos demais.

A faixa ótima de concentração de CPSIL e LPIL para a resposta viscosidade foi igual a 5 a 6 (%). Para a resposta sinérese, as concentrações de CPSIL na faixa ótima permaneceram compreendidas dentre 4 a 5 (%) e de LPIL dentre 4 a 6 (%).

O iogurte controle apresentou viscosidade e firmeza inferiores aos demais iogurtes formulados. A sinérese é, aproximadamente, vinte e sete vezes superior

aos iogurtes desenvolvidos. Verifica-se ainda a influência da concentração de CPSIL sobre o atributo elasticidade (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de viscosidade, firmeza, elasticidade e sinérese das formulações

Formulações	Viscosidade (mPa.s)	Firmeza (N)	Elasticidade (mm)	Sinérese (%)
Controle	352,00±2,64 ⁱ	0,03±0,00 ^g	8,36±0,22 ^{ghij}	54,91±1,69 ^a
1	726,16±2,46 ^e	0,07±0,00 ^f	9,00±0,03 ^{efj}	1,75±0,00 ^b
2	739,00±1,00 ^d	0,07±0,00 ^f	9,27±0,12 ^{cdefh}	1,39±0,6 ^b
3	716,00±1,73 ^f	0,08±0,00 ^{de}	9,29±0,37 ^{cdefg}	1,16±1,00 ^b
4	886,00±3,60 ^a	0,1±0,00 ^{ab}	10,43±0,07 ^b	0,11±0,19 ^b
5	674,66±4,16 ^g	0,09±0,00 ^{ce}	9,24±0,38 ^{cdef}	2,07±0,52 ^b
6	854,66±3,51 ^b	0,1±0,00 ^a	12,12±0,83 ^a	0,11±0,20 ^b
7	666,00±2,64 ^h	0,07±0,00 ^f	9,57±0,33 ^{bf}	0,57±0,99 ^b
8	862,33±2,30 ^b	0,1±0,00 ^a	10,27±0,49 ^{bc}	0,00±0,00 ^b
9	776,00±1,00 ^c	0,09±0,00 ^{cd}	9,88±0,16 ^{be}	0,11±0,20 ^b
10	768,33±3,51 ^c	0,09±0,00 ^{bc}	10,17±0,45 ^{bd}	0,11±0,20 ^b

Média ± desvio-padrão da média, n=3. Médias na mesma coluna com letras sobrescritas diferentes possuem diferença estatística ($p < 0,05$).

Estes resultados indicam a atuação benéfica do concentrado proteico de soro de leite isento de lactose em relação aos aspectos reológicos dos iogurtes. Krzeminski, Grobtable, Hinrichs (2011) também observaram a atuação positiva das proteínas do soro de leite sobre o tamanho das partículas, firmeza e viscosidade de iogurtes. As proteínas do soro de leite agem de maneira a promover as interações entre partículas, assim como, a agregação das mesmas, sendo estas, características de interesse para iogurtes, principalmente, do tipo concentrado.

Assim como, a presença de FOS na concentração de 3%, sendo este valor fixo para todas as formulações, é um fator com possível atuação sobre o aumento dos aspectos viscosidade e firmeza dos iogurtes, como verificado por Seckin & Ozkilinc (2011).

Desta forma, o concentrado proteico de soro de leite pode ser utilizado em substituição parcial ao leite em pó desnatado, que normalmente é aplicado

industrialmente em produtos lácteos como iogurtes (Guzmán-González, Morais, Ramos, Amigo, 1999). A proporção dominante e exacerbada de proteínas do soro de leite em relação à caseína, pode ocasionar efeitos desagradáveis como granulidade e heterogeneidade do produto (Krzeminski, Grobhable, Hinrichs, 2011).

Portanto, os tratamentos 4 (5% CPSIL/ 5% LPIL), 6 (5,414214% CPSIL/ 4% LPIL) e 8 (4% CPSIL/ 5,414214% LPIL) foram selecionados para posterior análise sensorial. Segue abaixo Tabela 3 contendo os resultados da caracterização físico-química destas formulações.

Tabela 3 – Caracterização físico-química das formulações

	Formulação 4	Formulação 6	Formulação 8
Lactose (g. 100 g ⁻¹)	0	0	0
Glicose (g. 100 g ⁻¹)	1,47 ± 0,08 ^a	1,25 ± 0,18 ^a	1,26 ± 0,05 ^a
Galactose (g. 100 g ⁻¹)	1,65 ± 0,31 ^a	1,56 ± 0,28 ^a	1,71 ± 0,07 ^a
Ácido Láctico (g. 100 g ⁻¹)	1,30 ± 0,01 ^a	1,49 ± 0,03 ^a	1,46 ± 0,09 ^a
pH	4,81 ± 0,01 ^a	4,79 ± 0,00 ^a	4,79 ± 0,00 ^a
Proteína (g. 100 g ⁻¹)	8,04 ± 0,70 ^a	7,94 ± 0,39 ^a	7,41 ± 0,40 ^a
Gordura (g. 100 g ⁻¹)	6,05 ± 1,01 ^a	5,26 ± 0,83 ^a	4,51 ± 0,87 ^a
Cinzas (g. 100 g ⁻¹)	1,39 ± 0,06 ^a	1,38 ± 0,06 ^a	1,37 ± 0,16 ^a
Cálcio (mg. 100 g ⁻¹)	215,16 ± 1,94 ^a	220,05 ± 5,42 ^a	155,68 ± 5,27 ^b
Fibras totais (g. 100 g ⁻¹)	3,05 ± 0,05 ^a	3,02 ± 0,04 ^a	3,00 ± 0,03 ^a
Umidade (%)	79,35 ± 0,37 ^a	79,25 ± 0,28 ^a	79,29 ± 0,29 ^a
Sólidos totais (g. 100 g ⁻¹)	20,86 ± 0,37 ^a	20,74 ± 0,28 ^a	20,70 ± 0,29 ^a

Média ± desvio-padrão da média, n=3. Médias na mesma linha com letras sobrescritas diferentes possuem diferença estatística ($p < 0,05$).

Por meio da análise cromatográfica foi possível verificar a isenção de lactose nas formulações de iogurte. Na isenção de lactose no produto lácteo e consequente aumento dos monossacarídeos resultantes da hidrólise, as bactérias lácticas utilizam, principalmente, a glicose como principal substrato para fornecimento de energia e liberação de ácido láctico, desta forma, as concentrações de galactose

foram superiores às de glicose, assim como, encontrado por Pescuma, Hébert, Mozzi & Font de Valdez (2010) ao analisarem o desenvolvimento de bactérias lácticas em bebida fermentada contendo concentrado proteico de soro de leite (35% de proteína).

A legislação brasileira exige que a acidez de iogurtes (g de ácido láctico.100 g⁻¹) seja inferior à 1,5 (Brasil, 2007). Os três produtos atendem aos teores de ácido láctico exigidos pela legislação.

A média dos pHs dos iogurtes foram semelhantes aos encontrados na literatura para iogurtes gregos. Tarakci, Temiz & Ugur (2011) obtiveram valores de pHs dentre 4,01 ± 0,02 a 4,36 ± 0,02. Kaaki, Kebbe Baghdadi, Najm & Olabi (2012) obtiveram valores entre 4,12 ± 0,20 a 4,21 ± 0,20. Abu-Jdayil & Mohameed (2012) encontraram valores de pH de, aproximadamente, 4,40 a 3,50 decaindo conforme o tempo de armazenagem de 0 a 14 dias, respectivamente.

Além disso, a concentração proteica dos iogurtes permaneceu entre 7,41 e 8,04 g.100g⁻¹. Os iogurtes produzidos possuíram concentração proteica acima da média dos iogurtes gregos zero lactose sem adição de polpas de frutas ou outros preparados comercializados no Brasil (Tabela 4).

Tabela 4 – Concentração proteica de iogurtes gregos zero lactose comercializados no Brasil

Marca	Produto	Concentração proteica (g. 100 g ⁻¹)
A	logurte grego zero lactose e zero gordura	7,5
A	logurte grego zero lactose tradicional	5
B	logurte grego zero lactose original	3,9
B	logurte grego zero lactose, gordura e açúcares	5,5

Valores expressos nos rótulos dos produtos.

Esta concentração proteica elevada é explicada pela adição de concentrado proteico de soro de leite, visto que, apesar de não apresentar diferença

estatisticamente significativa, concentrações mais elevadas de concentrado proteico de soro de leite resultaram em maiores teores de proteína. Foi observado que nenhum dos iogurtes comerciais citados possuem em sua composição o concentrado proteico de soro de leite.

Por meio da adição de 1% e 2% de concentrado proteico de soro de leite (35% de proteína) e 1,13% e 2,25% de leite desnatado em pó, Vénica, Perotti & Bergamini (2014) obtiveram iogurtes com concentrações proteicas de 3,87 a 4,50 ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$), respectivamente. A adição de concentrado proteico de soro de leite vem se mostrando uma alternativa viável, principalmente, pelo fato de aumentar o fornecimento e colaborar com o aporte proteico, como também, promover algumas características sensoriais de interesse, como textura e viscosidade.

Além da perspectiva quantitativa, é importante considerar a qualidade da proteína, visto que, as proteínas do soro de leite apresentam todos os aminoácidos essenciais (Sgarbieri, 2004), incluindo os aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), sendo reconhecidas como proteínas de alto valor biológico e de rápida absorção (Hulmi, Lockwood, Stout, 2010).

No que se refere à gordura, a formulação 4 apresentou concentração superior às das demais, porém, não houve diferença estatística significativa. Pela legislação brasileira aplicada a leites fermentados, as formulações 6 e 8 seriam consideradas integrais em seu conteúdo de matéria gorda, a formulação 4 seria denominada iogurte com creme, pois apresenta concentração de gordura superior à 6,0 ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) (Brasil, 2007). Tamime & Robinson (2007) pesquisaram a concentração de gordura de diversos iogurtes gregos produzidos por ultrafiltração, adição de matéria gorda ou por meio de separadores mecânicos, a concentração média encontrada foi de 6,1 a 9,2 ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$).

Neste estudo, o método de obtenção dos iogurtes gregos foi por meio da adição de ingredientes (estabilizante/espessante, concentrado proteico de soro de leite, leite em pó, frutooligossacarídeo) que promovem as características de interesse para iogurtes gregos.

A concentração de cinzas dos iogurtes ($1,37 \pm 0,06$ a $1,39 \pm 0,06$ g.100g⁻¹) é elevada quando comparada a outros iogurtes concentrados. Serafeimidou, Zlatanov, Laskaridis e Sagredos (2012) pesquisaram vinte e quatro amostras de iogurtes gregos comercializados na Grécia, as concentrações de cinzas permaneceram entre $0,632 \pm 0,022$ a $1,107 \pm 0,006$ (g.100g⁻¹).

O teor de cálcio dos iogurtes deve-se à adição de carbonato de cálcio. Quando comparado aos comumente utilizados em alimentos, o carbonato de cálcio possui a maior concentração do mineral em questão (Weaver, Heaney, 2006). Através da suplementação de cálcio, foi possível atingir entre 15,56% a 22% da ingestão diária recomendada para adultos (Brasil, 2005). Os iogurtes com maiores concentrações de CPSIL ($\geq 5\%$) obtiveram maiores teores de cálcio, visto que, o CPSIL apresentou $806,21 \pm 5,40$ (mg.100g⁻¹) de cálcio, enquanto que, para o LPIL este valor foi igual a $590,19 \pm 1,11$ (mg.100g⁻¹).

Os produtos atingiram também 40% da ingestão diária recomendada para adultos no que se refere à vitamina D (Brasil, 2005).

Estudos indicam significativa associação entre a má-absorção da lactose ou auto-percepção desta condicionalidade e o baixo consumo de cálcio e vitamina D, sendo assim, o desenvolvimento de produtos alimentícios que atendam esta condição pode auxiliar na adequada ingestão destes nutrientes (Madry et al., 2012; Barr, 2013; Lehtimäki et al., 2006).

Por meio da adição de FOS, as três formulações de iogurte poderiam

possuir alegação prebiótica, pois atenderam a recomendação brasileira vigente no que se refere ao conteúdo de fibras alimentares ($\geq 2,5$ g por porção) (Brasil, 2012). Este produto foi analisado por HPLC, onde verificou-se a presença de 8% de frutose na forma livre, indicando que o produto se apresentava íntegro e que atuaria como fibra alimentar.

O FOS é uma substância não digerível que atua como prebiótico e modula a microbiota intestinal, exibindo assim, um papel importante aos intolerantes à lactose que muitas vezes apresentam desequilíbrio na composição das bactérias comensais endógenas presentes no intestino. O FOS é fermentado pelas bactérias benéficas do cólon, lactobacilos e bifidobactérias, formando ácidos graxos de cadeia curta que possuem a capacidade de impulsionar a proliferação celular do enterócito, além de estimular o funcionamento do sistema imune e, ainda, regular o metabolismo lipídico limitando a lipogênese e colesterogênese (Sabater-Molina, Larque, Torella, Zamora, 2009; Roberfroid et al., 2010).

Este componente das formulações possui ação benéfica sobre a absorção de minerais, principalmente de cálcio. A produção dos ácidos graxos de cadeia curta promove a diminuição do pH instestinal que converte o cálcio insolúvel em sua forma iônica favorecendo sua absorção (Pandey, Naik, Vakil, 2015).

Além dos benefícios nutricionais, o FOS apresenta propriedades tecnológicas, sendo um substituto da sacarose, possuindo grande capacidade de retenção de água, alta solubilidade e estabilidade e baixa oferta energética (Sabater-Molina, Larque, Torella, Zamora, 2009).

O teor de umidade do iogurte grego elaborado por Lteif, Olabi, Kebbe Baghdadi & Toufeili (2009) foi igual a 76,81 (%), ligeiramente inferior quando comparado aos valores de umidade dos iogurtes da presente pesquisa ($79,25 \pm 0,28$

a $79,35 \pm 0,37\%$), no entanto, estes valores encontram-se na faixa média de umidade de sete marcas diferentes de iogurtes gregos comercializados em Beirut no Líbano, local onde este tipo de iogurte é popular ($76,87 \pm 1,98\%$) (Kaaki, Kebbe Baghdadi, Najm, 2012).

5.3. Análise microbiológica das formulações

Os resultados das análises microbiológicas, para as três formulações de iogurtes, foram inferiores aos estabelecidos pela legislação brasileira (Brasil, 2001; Brasil, 2007). Os iogurtes apresentaram: mesófilos $< 4,73 \cdot 10^3$ UFC/g, coliformes totais < 93 NMP/g e termotolerantes < 3 NMP/g, *Staphylococcus aureus* < 23 NMP/g, bolores e leveduras ausentes e *Bacillus cereus* $< 1 \cdot 10$ UFC/g. Houve ausência de *Salmonella* sp nas três amostras analisadas.

A média da contagem de bactérias lácticas foi igual a $6,90 \pm 0,63$ log UFC/g para a amostra 4; $6,88 \pm 0,67$ log UFC/g para a amostra 6 e $6,91 \pm 0,68$ log UFC/g para a amostra 8. Estes resultados respeitam a contagem mínima de bactérias lácticas estabelecida pela legislação brasileira para iogurtes (10^7 UFC/g). A contagem destas bactérias, nos três iogurtes, não diferiu significativamente entre si ($p > 0,05$).

A partir destes resultados as amostras de iogurte tiveram sua inocuidade atestada e seu consumo por provadores participantes da análise sensorial pode ser realizado.

5.4. Avaliação sensorial das formulações

As médias, obtidas por meio de aplicação da escala hedônica de nove pontos, demonstraram que a formulação com maior concentração de concentrado proteico de soro de leite (5,41%) resultou em aceitação geral superior às demais formulações com menores concentrações deste ingrediente. No entanto, apesar da média da formulação 6 ser superior, não houve diferença estatística entre as três formulações testadas ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Avaliação sensorial das formulações

Formulações	4	6	8
Aceitabilidade geral	6,61 ^a ± 1,71	6,7 ^a ± 1,74	6,57 ^a ± 1,78

Média ± desvio-padrão da média, n=3. Médias na mesma linha com letras sobrescritas diferentes possuem diferença estatística ($p < 0,05$).

As médias se mantiveram na faixa entre o ponto 7 (gostei moderadamente) e o ponto 6 (gostei ligeiramente). Em relação à formulação 4, 60% dos participantes (69 provadores) selecionaram as opções 7 (gostei moderadamente), 8 (gostei muito) ou 9 (gostei muitíssimo). Para a formulação 6, 61,73% dos participantes (71 provadores) pontuaram da mesma maneira. E quanto à formulação 8, a porcentagem foi igual a 63,47% (73 provadores).

Embora seja uma prática a inclusão de açúcar a fim de melhorar as características sensoriais dos produtos alimentícios, não foram adicionados açúcares e edulcorantes nos iogurtes, visto que, sua adição intencional deve ser reduzida de forma a atingir a proporção máxima de 10% do total consumido no dia, conforme recomenda a World Health Organization (2015). Essa recomendação objetiva a redução das cáries dentais, assim como, a prevenção e controle do ganho

de peso não saudável que é fator mediador de inúmeras doenças não transmissíveis, dentre essas, diabetes tipo II e doenças cardiovasculares.

Mesmo sem adição de açúcares e edulcorantes artificiais, uma característica proeminente dos iogurtes foi a doçura acentuada, visto que, os açúcares resultantes do processo de hidrólise possuem poder edulcorante superior ao da lactose (Ganzle, Haase, Jelen, 2008).

Os resultados provenientes da análise sensorial indicaram que, apesar de se tratar de iogurtes gregos naturais, as médias de aceitabilidade geral foram superiores quando comparadas aos iogurtes produzidos com 5%, 10% e 15% de suco de frutas (maçã, laranja, banana, abacaxi), que obtiveram médias iguais a $4,38 \pm 0,32$, $5,19 \pm 0,32$ e $5,12 \pm 0,44$, respectivamente (Senaka Ranadheera, Evans, Adams, Baines, 2012). Lteif, Olabi, Kebbe Baghdadi & Toufeili (2009) produziram iogurtes gregos naturais com leite bovino, de cabra e de ovelha e tiveram médias de aceitabilidade geral iguais a 5,96, 3,65, 4,44, respectivamente, sendo estas inferiores às do presente trabalho.

Sendo assim, este estudo indica que o concentrado proteico de soro de leite pode ser utilizado em produtos alimentícios, neste caso, iogurte, apresentando influência positiva sobre as características reológicas, nutricionais e de aceitação geral.

O presente artigo, procura atender à necessidade em assumir a co-responsabilidade na promoção do Direito Humano à Alimentação Adequada (DHAA), mediante a ampliação, inovação e aperfeiçoamento dos produtos disponíveis. Não apenas com o intuito de atender o crescente número de pessoas que possuem restrição à ingestão de lactose, e que conseqüentemente, diminuem e/ou deixam de ingerir leite e seus derivados, mas também com o objetivo de estimular o uso e

desenvolvimento de tecnologias que atuam promovendo a sustentabilidade e o uso de subprodutos da indústria de laticínios, como é o caso do soro de leite (Gulseven, Wohlgenant, 2014).

6. Conclusão

Conclui-se que, por meio das condições e metodologia aplicadas com duas enzimas beta-galactosidades comerciais de diferentes fornecedores, foi possível alcançar 100% de hidrólise da lactose presente no concentrado proteico de soro de leite utilizado na formulação de iogurtes isentos de lactose. O processo de hidrólise enzimática da lactose permite que os produtos possam ser consumidos por intolerantes à lactose, parcela significativa da população, porém, para pessoas com alergia às proteínas do leite bovino, a ingestão destes alimentos não é recomendada, visto que, a concentração proteica dos mesmos é elevada.

Os resultados confirmam os efeitos benéficos exercidos pela adição de concentrado proteico de soro de leite isento de lactose nos aspectos reológicos avaliados dos iogurtes. Além disto, a adição deste ingrediente contribuiu com o aumento do teor proteico e de cálcio dos iogurtes. Os iogurtes desenvolvidos são ainda ricos em fibras solúveis e vitamina D.

A aplicação do teste de escala hedônica evidenciou que apesar de obter a maior média, a formulação com maior concentração de CPSIL teve sua aceitação geral igual às outras duas formulações testadas.

Desta forma, os resultados evidenciaram que a aplicação, em iogurtes, de concentrado proteico de soro de leite isento de lactose pode ser considerada uma prática com grande potencial.

Conflito de interesse

Os autores referem não haver conflito de interesses e agradecem e assumem o apoio financeiro recebido pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná.

Referências

Abu-Jdayil, B., & Mohameed, H. (2002). Experimental and modelling studies of the flow properties of concentrated yogurt as affected by the storage time. *Journal of Food Engineering*, 52(4), 359–365. [http://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00127-3](http://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00127-3)

American Public Health Association - APHA. (2005). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (21 ed.). Washington: American Public Health Association.

Association of Official Analytical Chemists – AOAC. (2000). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. (17th ed.) Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists.

Barr, S. I. (2013). Perceived lactose intolerance in adult Canadians: a national survey. *Applied physiology nutrition and metabolism*, 38(8), 830-835. <http://doi.org/10.1139/apnm-2012-0368>

Brasil. (1997). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 369 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leite em pó. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 04.09.1996. Seção 1, p. 19699.

Brasil. (2001). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 12 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 7, 12.01.2001. Seção 1, p. 45.

Brasil. (2005). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22.09.2005. Seção 3, p. 372.

Brasil. (2007). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial da União, Brasília, 24.10.2007. Seção 1, p. 4.

Brasil. (2012). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 54 de 12 de novembro de 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12.11.2012. Seção 1, p. 122.

Brookfield. (2014). *Manual de instruções de operações nº. M/03-165-C0508*. http://www.eng.uc.edu/~beaucag/Classes/Characterization/DV2Pro_Manual.pdf. Acesso em: 27.11.14.

Candido, L. M. B., Kruger, C. C. H. (2012). *Inovação nos processos de obtenção, purificação e aplicação de componentes do leite bovino*. São Paulo: Atheneu.

Dutcosky, S. D. (2011). *Análise sensorial de alimentos*. (3 ed. rev. e ampl.). Curitiba: Coleção Exatas.

Enattah, N. S., Sahi, T., Savilahti, E., Terwilliger, J. D., Peltonen, L., & Järvelä, I. (2002). Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature Genetics*, 30(2), 233–237. <http://doi.org/10.1038/ng826>

Essig, A. M.; Kleyn, D. H. (1983). Determination of lactose in milk: Comparison of methods. *Association of Official Analytical Chemists*, 66(1), 1514-1516.

Friedrich, D. C., Santos, S. E. B., Ribeiro-dos-Santos, Â. K. C., & Hutz, M. H. (2012). Several Different Lactase Persistence Associated Alleles and High Diversity of the Lactase Gene in the Admixed Brazilian Population. *PLoS ONE*, 7(9), 1–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0046520>

Ganzle, M. G., Haase, G., & Jelen, P. (2008). Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal*, 18(7), 685–694. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.003>

Gulseven, O., & Wohlgenant, M. (2014). Demand for functional and nutritional enhancements in specialty milk products. *Appetite*, 81, 284–294. <http://doi.org/10.1016/j.appet.2014.06.105>

Guzmán-González, M., Morais, F., Ramos, M., Amigo, L. (1999). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type model system: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk power. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(8), 1117-1122. 10.1002/(SICI)1097-0010(200003)80:4<433::AID-JSFA545>3.0.CO;2-B

Harju, M., Kallioinen, H., & Tossavainen, O. (2012). Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*, 22(2), 104–109. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.09.011>

Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*, 6(1), 25. <http://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>

Hulmi, J. J., Lockwood, C. M., & Stout, J. R. (2010). Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. *Nutrition & Metabolism*, 7, 51. <http://doi.org/10.1186/1743-7075-7-51>

Husain, Q. (2010). Beta galactosidases and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(1), 41–62. <http://doi.org/10.3109/07388550903330497>

Instituto Adolfo Lutz. (2008). *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos* (4. ed.). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.

Kaaki, D., Kebbe Baghdadi, O., Najm, N. E., & Olabi, A. (2012). Preference mapping of commercial Labneh (strained yogurt) products in the Lebanese market. *Journal of Dairy Science*, 95(2), 521–532. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4409>

Klein, M. P., Fallavena, L. P., Schöffner, J. D. N., Ayub, M. A. Z., Rodrigues, R. C., Ninow, J. L., & Hertz, P. F. (2013). High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 465–470. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.044>

Krzeminski, A., Grobhable, K., & Hinrichs, J. (2011). Structural properties of stirred yoghurt as influenced by whey proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2134–2140. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.018>

Lehtimäki, T., Hemminki, J., Rontu, R., Mikkilä, V., Räsänen, L., Laaksonen, M., ... Raitakari, O. (2006). The effects of adult-type hypolactasia on body height growth and dietary calcium intake from childhood into young adulthood: a 21-year follow-up study--the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Pediatrics*, 118(4), 1553–9. <http://doi.org/10.1542/peds.2006-0542>

Lteif, L., Olabi, A., Kebbe Baghdadi, O., & Toufeili, I. (2009). The characterization of the physicochemical and sensory properties of full-fat, reduced-fat, and low-fat ovine and bovine Halloumi. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4135–4145. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2070>

Madry, E., Krasinska, B., Drzymala-Czyz, S., Sands, D., Lisowska, A., Grebowiec, P., ... Walkowiak, J. (2012). Lactose malabsorption is a risk factor for decreased bone mineral density in pancreatic insufficient cystic fibrosis patients. *European journal human genetics*, 20(10), 1092–1095. <http://doi.org/10.1038/ejhg.2012.52>

Mattar, R., Monteiro, M. S., Villares, C. a, Santos, A. F., Silva, J. M. K., & Carrilho, F. J. (2009). Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. *Nutrition Journal*, 8, 46. <http://doi.org/10.1186/1475-2891-8-46>

Moreira, T., Kruger, C. C. H., Passos, M., Candido, L. M. B. (2015). Elaboration of yogurt with reduced level of lactose added of carob (*Ceratonia siliqua* L.). In *11 SLACA - Simpósio latino americano de ciência de alimentos* (Vol. 2). ISSN: 2447-2840

Muehlhoff, E., Bennett, A., McMahon, D. (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): *Milk and dairy products in human nutrition*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Nsabimana, C., Jiang, B., & Kossah, R. (2005). Manufacturing, properties and shelf life of labneh: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 58(3), 129–137. <http://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2005.00205.x>

Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577–7587. <http://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>

Pereira, G. a. P., Genaro, P. S., Pinheiro, M. M., Szejnfeld, V. L., & Martini, L. a. (2009). Cálcio dietético: estratégias para otimizar o consumo. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 49(2), 164–171. <http://doi.org/10.1590/S0482-50042009000200008>

Pescuma, M., Hébert, E. M., Mozzi, F., & Font de Valdez, G. (2010). Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1-2), 73–81. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011>

Riener, J., Noci, F., Cronin, D. A., Morgan, D. J., Lyng, J. G. (2010). A comparison of selected quality characteristics of yoghurts prepared from thermosonicated and conventionally heated milks. *Food Chemistry*, 119(3), 1108-1113.

Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., ... Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *The British Journal of Nutrition*, 104 Suppl(November), S1–63. <http://doi.org/10.1017/S0007114510003363>

Sabater-Molina M., Larque E., Torrella F., and Zamora, S. (2009). Dietary fructooligosaccharides. *Ovid MEDLINE(R)Journal of Physiology & Biochemistry*, 65(3), 315–328.

Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., & Vernon-Carter, E. J. (2004). Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal*, 14(2), 151–159. [http://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00166-3](http://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00166-3)

Seckin, A. K., Ozkilinc, A. Y. (2011). Effect of some prebiotics usage on quality properties of concentrated yogurt. *Journal of animal and veterinary advances*, 10(9), 1117-1123. <http://doi.org/10.3923/javaa.2011.1117.1123>

Senaka Ranadheera, C., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food Chemistry*, 135(3), 1411–1418. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.025>

Serafeimidou, A., Zlatanov, S., Laskaridis, K., & Sagredos, A. (2012). Chemical characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of

traditional Greek yogurts. *Food Chemistry*, 134(4), 1839–1846.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.102>

Sgarbieri, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. (2004). *Revista de Nutrição*, 17(4), 387-409. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732004000400001>

Sigma-aldrich. *HPLC Columns for Carbohydrates*. (2014).
<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=9660535>. Acesso em: 26.11.14.

Supermercado moderno. *Perecíveis: lácteos resfriados*. (2016).
http://www.sm.com.br/portal/Principal/arquivos/Revista/193/upload/SM_201605_lowres_final.pdf. Acesso em: 14.06.16.

Tamime, A. Y., Robinson, R. K. (2007). *Tamime and Robinson's yogurt, science and technology* (3rd ed). Washington: CRC Press.

Tarakci, Z., Temiz, H., & Ugur, A. (2011). The effect of adding herbs to labneh on physicochemical and organoleptic quality during storage. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 108–116. <http://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00636.x>

Teixeira, C. O. (2011). *Efluentes de laticínios, enquadramento legal e a representação dos técnicos e gerentes*. (dissertação de mestrado profissional em ciência e tecnologia do leite e derivados - Universidade Federal de Juiz de Fora). Retirado de <http://www.ufjf.br/mestradoleite/files/2013/01/Dissertação-final10.pdf>

Vasileva, N., Ivanov, Y., Damyanova, S., Kostova, I., & Godjevargova, T. (2016). Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -galactosidase in a bioreactor with a spirally wound membrane. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 339–346. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.025>

Vénica, C. I., Perotti, M. C., & Bergamini, C. V. (2014). Organic acids profiles in lactose-hydrolyzed yogurt with different matrix composition. *Dairy Science and Technology*, 94(6), 561–580. <http://doi.org/10.1007/s13594-014-0180-7>

Victor, B., & Pavel, J. (1985). Lactose Hydrolysis by *Kluyveromyces lactis* β -D Galactosidase in Skim Milk, Whey, Permeate and Model Systems. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 18(1), 97–99.
[http://doi.org/10.1016/S0315-5463\(85\)71728-2](http://doi.org/10.1016/S0315-5463(85)71728-2)

Weaver, C. M., Heaney, R. P. editores. (2006). *Calcium in human health*. New Jersey: Humana press inc.

Wolf, I. V., Vénica, C. I., & Perotti, M. C. (2015). Effect of reduction of lactose in yogurts by addition of β -galactosidase enzyme on volatile compound profile and quality parameters. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(5), 1076–1082. <http://doi.org/10.1111/ijfs.12745>

World Health Organization – WHO. (2015). *Guideline: Sugars intake for adults and children*. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149782/1/9789241549028_eng.pdf?ua=1. Accesso em: 02.06.2015.