



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

WIDSON MICHAEL DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE SORO DE QUEIJO DE CABRA SECO EM *SPRAY DRYER* E
AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO PROTEICA NA PRESENÇA DE BACTÉRIAS
PROBIÓTICAS COMERCIAIS**

CAMPINA GRANDE – PB
2014

WIDSON MICHAEL DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE SORO DE QUEIJO DE CABRA SECO EM *SPRAY DRYER* E
AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO PROTEICA NA PRESENÇA DE BACTÉRIAS
PROBIÓTICAS COMERCIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Flávia Carolina Alonso Buriti

CAMPINA GRANDE – PB
2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S237c Santos, Widson Michael dos.
Caracterização de soro de queijo de cabra seco em Spray Dryer e avaliação da degradação proteica na presença de bactérias probióticas comerciais. [manuscrito] / Widson Michael dos Santos. - 2014.
44 p. : il. color.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.
"Orientação: Prof. Dra. Flávia Carolina Alonso Buriti, Departamento de Farmácia".

1. Alimento funcional. 2. Probióticos. 3. Proteólise. 4. Soro lácteo de cabra I. Título.

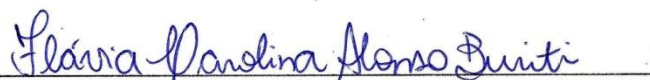
21. ed. CDD 660

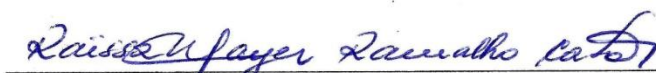
WIDSON MICHAEL DOS SANTOS

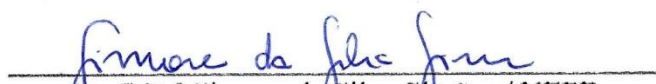
**CARACTERIZAÇÃO DE SORO DE QUEIJO DE CABRA SECO EM *SPRAY DRYER* E
AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO PROTEICA NA PRESENÇA DE BACTÉRIAS
PROBIÓTICAS COMERCIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 1 /12/2014.


Profª Drª Flávia Carolina Alonso Buriti / UEPB
Orientadora


Profª Drª Raissa Mayer Ramalho Catão / UEPB
Examinadora


Profª Drª Simone da Silva Simões / UEPB
Examinadora

DEDICATÓRIA

À minha mãe, por todo o amor e toda a força,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial, por guiar meus passos. À minha mãe, Maria de Fátima Santos, e à minha avó, Maria de Lourdes Santos, por todo amor, força e companheirismo. A minha irmã Emily, por ter trazido tanta luz e alegria a minha vida e a minha família. À todos os meus parentes que me apoiaram nessa estrada, especialmente ao meu padrasto, Ivaldo, e meu pai, Williams.

À minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Flávia Carolina Alonso Buriti, por todo o empenho, generosidade e ensino durante esses três anos de pesquisa.

À banca examinadora, Prof^ª Dr^ª Raíssa Mayer Ramalho Catão e Prof^ª Simone da Silva Simões, por aceitarem fazer parte da avaliação e pelas contribuições para o aperfeiçoamento do meu trabalho.

Ao Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos (LCTA/UEPB) e todos seus funcionários, por ter sido meu ambiente de pesquisa e conhecimento. Aos laboratórios de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM/UEPB), de Química Analítica Quantitativa (LQAQ/UEPB), de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO/UEPB), de Genética do Complexo Integrado de Pesquisa Três Marias/UEPB, de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas (LAPPA/UFCEG) e de Tecnologia de Grãos e Cereais (LTGC/CCTA/UFCEG) pela parceria e disponibilização de seus instrumentos de análise e auxílio técnico. À Embrapa Caprinos e Ovinos (Sobral – CE) pelo fornecimento dos lotes de soro e à empresa Dupont pelo fornecimento de parte das culturas lácticas usadas neste estudo.

À Michely, pelo companheirismo e forte parceria durante todo o período de pesquisa e desenvolvimento deste trabalho. Aos amigos de longa data que me acompanham desde antes do início da minha vida acadêmica, em especial Luana Noblat e Adraine. Aos amigos e colegas de classe, em especial à Fernanda, Gabriela, Alinne, Cheila, Maísa, Danielly, Maria, Alfredo, Márcia, Thaís e Yargo, pela forte amizade construída durante os últimos cinco anos e por tornarem a rotina exaustiva em uma das coisas mais divertidas e prazerosas que já vivi.

RESUMO

O soro é a fração solúvel do leite rica em proteínas, minerais e lactose, que é separada da caseína durante a produção de queijo. Apesar do alto valor nutricional agregado, este subproduto da fabricação de queijos é amplamente descartado no meio ambiente, embora possa ser aproveitado pelas indústrias de alimentos e pela área da biotecnologia. Diversas pesquisas recentes apontam o soro lácteo caprino como potencial alimento funcional, principalmente por sua constituição proteica e pelos produtos da degradação enzimática de suas proteínas. A tecnologia de secagem em *spray dryer* é considerada uma alternativa para o prolongamento da vida útil do soro lácteo, viabilizando sua aplicação na produção de novos produtos. Tendo ênfase no aumento do período de conservação do soro lácteo caprino e no aproveitamento desse subproduto para a obtenção de alimentos funcionais, o presente estudo envolveu a caracterização do soro de queijo coalho caprino antes e após a secagem por atomização em *spray dryer*, a fermentação do soro reconstituído utilizando a cultura *starter* de *Streptococcus thermophilus* em co-cultura com micro-organismos probióticos do gênero *Lactobacillus* e a avaliação do efeito da secagem e da fermentação sobre as proteínas do soro. Para este fim, duas formulações de soro em pó reconstituído fermentado foram produzidas em quatro diferentes lotes (replicatas independentes): F1 (*Lactobacillus casei* BGP93 + *Streptococcus thermophilus* TA40) e F2 (*Lactobacillus paracasei* BGP1 + *Streptococcus thermophilus* TA40). Para avaliação da fermentação, os parâmetros de pH, acidez titulável e a viabilidade dos micro-organismos probióticos e *starter* foram analisados nas duas formulações de soro caprino. O efeito da secagem e dos micro-organismos probióticos sobre as proteínas do soro foi analisado pelo método espectrofotométrico *o*-ftaldialdeído (OPA) e por cromatografia líquida ultrarrápida em fase reversa (RP-UFLC). Não houve diferenças significativas entre as formulações com relação aos valores de pH em todos os períodos de amostragem avaliados ($p > 0,05$). No entanto, os valores de acidez em F1 foram significativamente mais elevados ($p < 0,05$) que F2. A viabilidade dos micro-organismos potencialmente probióticos, do gênero *Lactobacillus*, no produto manteve-se dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira para alimentos probióticos (acima de 8 - 9 log UFC na porção de 200 mL) ao longo de 7 dias de armazenamento sob refrigeração à 4 °C. A maior população de *Lactobacillus*, utilizados como co-cultura, durante a fermentação e ao longo do armazenamento foi obtida para a formulação F2, contendo *L. paracasei* BGP1, que diferiu significativamente de F1 ($p < 0,05$). Utilizando o método OPA, constatou-se atividade proteolítica sobre as proteínas do soro, devido ao aumento de grupos NH₃ livres no produto após a fermentação e armazenamento. O maior grau de proteólise foi observado na formulação F1, porém sem diferença significativa de F2 ($p > 0,05$). A análise do soro caprino por RP-UFLC indicou impacto do tratamento térmico sobre as proteínas do soro; entretanto, para melhor avaliação do efeito das bactérias probióticas sobre esse constituinte sugere-se testar modificações nos parâmetros cromatográficos.

Palavras-chave: Alimento funcional. Probióticos. Proteólise. Soro lácteo de cabra.

ABSTRACT

Whey is the soluble fraction of milk, rich in protein, minerals, and lactose, obtained by separation of casein during cheese production. Despite the high nutritional value, this by-product of cheese-making is largely discarded in the environment, although it can be used by food and biotechnology industries. Recent researches suggest that goat whey can be a potential functional food, mainly due its protein composition and the presence of products of protein enzymatic degradation. Spray dryer is considered an alternative method to extend the shelf-life of whey, enabling to use it in dairy production. The aim of this study was the characterization of goat cheese whey before and after spray drying, fermentation of reconstituted whey using co-cultures of *Streptococcus thermophilus* TA40 (DuPont) with probiotic strains of lactobacilli (*L. casei* BGP93, Sacco, and *L. paracasei* BGP1, Sacco), and evaluation of the effects of drying process and fermentation on whey proteins. For this purpose, two formulations of fermented reconstituted whey were produced in four different batches: F1 (*L. casei* BGP93 + *S. thermophilus* TA40) and F2 (*L. paracasei* BGP1 + *S. thermophilus* TA40). The pH, titratable acidity, and co-cultures viability were analyzed during the fermentation and storage at 4 °C. The extent of proteolysis, caused by heating and/or probiotic strains, was evaluated by *o*-phthaldialdehyde (OPA) spectrophotometric assay and ultrafast reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-UFLC). The pH values did not differed significantly between treatments in all sampling periods studied ($p > 0.05$). However, the acidity values in F1 were significantly higher ($p < 0.05$) than F2. The viability of probiotic *Lactobacillus* in these products was in accordance with the Brazilian regulatory standards (above 8 - 9 log CFU in a 200 ml portion) during 7 days of storage at 4 °C. The higher *Lactobacillus* population, used as co-culture, during fermentation and throughout the storage was obtained for F2, produced with *L. paracasei*, which differed significantly from F1 ($p < 0.05$). The proteolysis of whey proteins was detected, using the OPA method, due to increased free NH_3 groups in this product after the fermentation and storage period. The proteolysis tended to be slight higher in F1, but with no significant difference from F2 ($p > 0.05$). The RP-UFLC analysis of whey fractions showed an impact of heat treatment on whey proteins; however, to better evaluate the effect of probiotic bacteria on these proteins, it is suggested testing some changes in chromatographic parameters.

Keywords: Functional food. Goat cheese whey. Probiotics. Proteolysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Cromatograma do soro reconstituído sem culturas lácticas (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 (F1) no tempo inicial de fermentação (TI) 33
- Figura 2** – Cromatograma do soro reconstituído sem culturas lácticas (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. paracasei* BGP1 (F2) no tempo inicial de fermentação (TI) 33
- Figura 3** – Cromatograma do soro reconstituído sem culturas lácticas (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 (F1) no tempo final da fermentação (TF)..... 34
- Figura 4** – Cromatograma do soro reconstituído sem culturas lácticas (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. paracasei* BGP1 (F2) no tempo final da fermentação (TF)..... 34
- Figura 5** – Cromatograma do soro reconstituído sem culturas lácticas (SR) e das duas formulações de soro reconstituído (F1 e F2) após 1 dia de armazenamento (D1)..... 35
- Figura 6** – **Figura 6** - Cromatograma do soro reconstituído sem culturas lácticas (SR) e das duas formulações de soro reconstituído (F1 e F2) após 7 dias de armazenamento (D7)..... 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas e proporções dos micro-organismos utilizados para cada fermentação (tratamento)	22
Tabela 2 – Composição centesimal das amostras de soro de lácteo caprino em pó (média ± desvio padrão).....	27
Tabela 3 – Composição do soro lácteo não processado - fluido, <i>in natura</i> (média ± desvio-padrão).....	28
Tabela 4 – Valores de pH, acidez titulável e viabilidade dos micro-organismos utilizados na fermentação do soro caprino reconstituído (média ± desvio-padrão)	30
Tabela 5 – Proteínas totais (g/100 g) e atividade proteolítica específica (U/mg de proteína) nas amostras de soro caprino reconstituído fermentado com culturas lácticas probióticas (média ± desvio-padrão).....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	Enzima conversora de angiotensina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
D1	Um dia de armazenamento
D7	Sete dias de armazenamento
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
NIRS	Espectroscopia na região do infravermelho próximo
OPA	<i>O</i> -ftaldialdeído
RP-UFLC	Cromatografia líquida ultrarrápida de alta eficiência em fase reversa
SR	Soro em pó reconstituído
F1	Formulação 1
F2	Formulação 2
TCA	Ácido tricloroacético
TF	Tempo final de fermentação
TFA	Ácido trifluoroacético
TI	Tempo inicial de fermentação
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV-Vis	Ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS

- % Porcentagem
- °C Graus Celsius
- > Maior que
- < Menor que

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1	Soro caprino como alimento funcional	15
3.2	Probióticos.....	16
3.3	Soro caprino e peptídeos bioativos.....	17
3.4	Secagem do soro lácteo em <i>spray dryer</i>	18
3.5	Proteínas e peptídeos do leite e do soro: Metodologias de avaliação	19
4	METODOLOGIA	20
4.1	Obtenção do soro de queijo de cabra <i>in natura</i> e atomizado (em pó).....	20
4.2	Composição centesimal do soro de queijo de cabra atomizado	20
4.2.1	<i>Determinação do teor de sólidos totais (extrato seco total) e umidade</i>	20
4.2.2	<i>Determinação do teor de cinzas (resíduo mineral fixo)</i>	20
4.2.3	<i>Determinação do teor de gordura (lipídeos)</i>	21
4.2.4	<i>Determinação do teor de proteínas totais</i>	21
4.2.5	<i>Determinação do teor de carboidratos totais</i>	21
4.3	Fermentação do soro lácteo reconstituído	21
4.4	Avaliação das características físico-químicas e da viabilidade dos micro-organismos <i>starter</i> e probióticos no soro reconstituído fermentado.....	22
4.4.1	<i>pH e acidez titulável</i>	22
4.4.2	<i>Determinação das populações de <u>S. thermophilus</u>, <u>L. casei</u> e <u>L. paracasei</u></i>	22
4.5	Avaliação dos processamentos sobre as proteínas do soro	23
4.5.1	<i>Determinação de proteínas totais</i>	23
4.5.2	<i>Determinação do grau de proteólise</i>	23
4.5.3	<i>Análise em cromatografia líquida ultrarrápida em fase reversa (RP-UFLC)</i>	24
4.6	Análise estatística	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	Composição centesimal do soro de queijo de cabra	26

5.2	Caracterização do soro atomizado reconstituído fermentado	29
5.2.1	<i>Valores de pH e acidez e viabilidade das culturas lácticas no soro reconstituído durante a fermentação e armazenamento</i>	29
5.3	Avaliação do efeito dos processamentos sobre as proteínas do soro	31
5.3.1	<i>Avaliação da atividade proteolítica (grau de proteólise)</i>	31
5.3.2	<i>Análise em cromatografia líquida ultrarrápida em fase reversa (RP-UFLC).....</i>	32
6	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O soro é a fração solúvel do leite rica em proteínas, minerais e lactose, que é separada da caseína durante a produção de queijo. Em 2011 foram produzidos 867,1 mil toneladas de queijos no país segundo dados divulgados pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ, 2012). Considerando que 8 a 9 litros de soro são gerados na produção de 1 kg de queijo, anualmente são produzidos em média 7,5 milhões de toneladas de soro. A maior parte da produção de queijo de cabra no Brasil ocorre por pequenos ou médios produtores com pequena produtividade e padrões tecnológicos básicos, o que explica a escassez de dados científicos sobre a produção anual desse produto no país (TRANJAN *et al.* 2009; SOUZA *et al.*, 2010).

Entre os produtores, o soro é considerado um subproduto sem valor nutricional importante e é descartado sem nenhum tratamento. O soro como efluente possui uma demanda bioquímica de oxigênio (D.B.O.) de 500000 mg/L, sendo considerado um grave poluente ambiental. Uma alternativa para esse problema envolve a utilização do soro caprino para produção de produtos lácteos, promovendo maior agregação de valor nutricional e diversificação de produtos derivados de leite de cabra (TRANJAN *et al.*, 2009). O soro pode servir como base para produção de uma variedade de produtos e ingredientes, incluindo bebidas lácteas, ricotas, concentrados e hidrolisados proteicos, suplementos alimentares, lactose, entre outros (SODINI *et al.*, 2006;. DONKOR *et al.*, 2007; LEKSRISSOMPONG *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2010; WATARU *et al.*, 2011; CHURCHWARD-VENNE *et al.*, 2012; BORBA *et al.* 2014). A secagem em *spray dryer* é o método mais utilizado para a desidratação de produtos lácteos e constitui uma alternativa para o prolongamento da vida útil do soro de queijo de cabra, viabilizando sua aplicação na produção de produtos lácteos (ANANDHARAMAKRISHNAN *et al.*, 2008; REDDY *et al.*, 2014).

Recentes estudos indicam que o soro caprino tem importante potencial funcional, especialmente por sua constituição proteica. As proteínas do soro são de alto valor biológico e atualmente ganham notoriedade principalmente por atuarem na hipertrofia muscular associada a exercícios de resistência, modulação do peso corporal, redução de gordura e outras propriedades específicas (KORPELA *et al.*, 2008; PILVI *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2009; HULMI *et al.*, 2010; WATARU *et al.*, 2011). Além disso, a hidrólise dessas proteínas produzem peptídeos bioativos que são associados à modulação de funções fisiológicas diversas, apresentando atividade anti-hipertensiva, antibacteriana, imunomoduladora, entre outras (DIDELLOT *et al.*, 2006; ERIKSEN *et al.*, 2008; HAMMÉ *et al.*, 2009; HAMMÉ *et al.*, 2010; ALMAAS *et al.*, 2011; ESPEJO-CARPIO *et al.*, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar os constituintes do soro caprino seco em *spray dryer* e avaliar o efeito de bactérias probióticas sobre as proteínas do soro reconstituído.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os constituintes do soro de queijo de cabra seco em *spray dryer* e avaliar o efeito do processamento térmico sobre os constituintes.
- Avaliar a viabilidade dos micro-organismos utilizados na fermentação do soro reconstituído e as modificações no pH e acidez do produto.
- Avaliar o efeito da fermentação com bactérias probióticas sobre as proteínas do soro reconstituído.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Soro caprino como alimento funcional

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com a resolução nº 18 de 30/04/1999, define alimento funcional como todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos a saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica. No entanto, no meio científico não há um consenso sobre uma definição geral para alimentos funcionais e a maioria dos estudos é voltada para investigação da funcionalidade de micronutrientes (vitaminas e minerais) e macronutrientes (aminoácidos e proteínas) (ZANDEN *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, vários estudos apontam o soro como alimento funcional, principalmente por sua constituição proteica. O soro lácteo caprino possui composição proteica única que depende de diversos fatores, envolvendo época do ano, o tipo de alimentação, o estágio de lactação e qualidade do processamento. As proteínas majoritárias são β -lactoglobulina e α -lactoalbumina; em menores quantidades são presentes imunoglobulinas (Igs), albumina sérica, peptona-proteose, lactoferrina e caseínomacropeptídeo (DIDELLOT *et al.*, 2006; ERIKSEN *et al.*, 2008; KORPELA *et al.*, 2008; HAMMÉ *et al.*, 2009; PILVI *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2009; HAMMÉ *et al.*, 2010; HULMI *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2010; ALMAAS *et al.*, 2011; HERNÁNDEZ-LEDESMA *et al.*, 2011; WATARU *et al.*, 2011; ESPEJO-CARPIO *et al.*, 2013).

Essas proteínas são de alto valor biológico e têm adquirido amplo espaço na alimentação humana devido a propriedades funcionais específicas (PESCUMA *et al.*, 2010). Esse elevado consumo é explicado pelo reconhecimento de que proteínas do soro, conforme indicam alguns estudos, podem ajudar no ganho de massa muscular em combinação com exercícios de resistência. Portanto, concentrados dessas proteínas são amplamente utilizadas como suplemento alimentar por atletas para promover e manter o crescimento e resistência muscular (TANG *et al.*, 2009; HULMI *et al.*, 2010; WATARU *et al.*, 2011). Além disso, pesquisas indicam que proteínas do soro estão envolvidas na regulação do peso corporal (KORPELA *et al.*, 2008; PILVI *et al.*, 2009).

As proteínas do soro podem ser hidrolisadas liberando frações de aminoácidos com alta atividade biológica, denominados peptídeos bioativos, capazes de atuarem como

moduladores de diversas funções fisiológicas. Vários estudos investigaram *in vitro* as atividades biológicas de peptídeos derivados de proteínas do soro de cabra, sendo constatada ação anti-hipertensiva, anti-obesidade, imunomodulatória, antibacteriana, entre outras (DIDELOT *et al.*, 2006; ERIKSEN *et al.*, 2008; HAMMÉ *et al.*, 2009; HAMMÉ *et al.*, 2010; ALMAAS *et al.*, 2011; ESPEJO-CARPIO *et al.*, 2013).

3.2 Probióticos

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Para que se tenha o efeito desejado à saúde esses devem sobreviver através das barreiras gastrointestinais em número suficiente. Portanto, a seleção dessas bactérias tem como base os seguintes critérios: o gênero, a origem, a estabilidade frente ao ácido estomacal e aos sais biliares, a capacidade de aderir à mucosa intestinal, a capacidade de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrintestinal humano, a capacidade de produzir compostos antimicrobianos e a atividade metabólica no intestino (RAIZEL *et al.*, 2011; RANADHEERA *et al.*, 2014; CASAROTTI e PENNA, 2015).

Segundo a ANVISA (2008) a quantidade mínima viável para alimentos probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante.

Bebidas lácteas fermentadas constituem o principal veículo alimentar para micro-organismos probióticos. Cepas de *Lactobacillus* spp. têm recebido grande atenção como micro-organismos probióticos e, veiculadas em bebidas lácteas, têm sido associadas à numerosos efeitos benéficos à saúde (VARGA *et al.*, 2014).

Wang *et al.* (2012), em estudo sobre iogurte de leite de cabra fermentado com culturas lácticas probióticas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium* spp., constataram que, após 12 semanas de vida de prateleira, a viabilidade desses micro-organismos foi bem superior aos valores necessários para a obtenção de efeitos terapêuticos.

Xanthopoulos *et al.* (2012), em estudo realizado com iogurte desnatado de leite de cabra fermentado com diferentes culturas lácticas, constataram que a cultura de *L. paracasei* destacou-se pelas propriedades potenciais probióticas conferidas aos alimentos, tais como: resistência a baixo pH, tolerância a sais biliares, remoção de colesterol do meio, resistência à lisozimas, entre outras. Outros estudos demonstraram que micro-organismos probióticos do gênero *Lactobacillus* podem conferir potencial terapêutico aos produtos derivados de leite de

cabra, destacando-se a ação anti-hipertensiva (DIDELOT *et al.*, 2006; HAMMÉ *et al.*, 2009; HAMMÉ *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012)

3.3 Soro lácteo caprino e peptídeos bioativos

Peptídeos bioativos são definidos como componentes derivados das proteínas dos alimentos que, em complementação ao seu valor nutricional, exercem um efeito fisiológico ao organismo. Esses peptídeos são inativos quando íntegros dentro da sequência de aminoácidos da proteína principal e precisam ser liberados para exercer algum efeito (RYAN *et al.*, 2011).

Conforme revisado por Hernández-Ledesma *et al.* (2014), alimentos proteicos são normalmente hidrolisados em uma larga variedade de peptídeos durante o processo de digestão gastrointestinal. Alguns dos peptídeos liberados compartilham de características estruturais semelhantes a peptídeos endógenos, podendo agir no organismo como moduladores agonistas ou antagonistas de funções fisiológicas. Dentre as propriedades dessas moléculas biologicamente ativas se destacam a ação anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antioxidante, hipocolesterolêmica, modulação na absorção de minerais, ação contra diabetes mellitus tipo 2, atividade antimicrobiana, imuno-moduladora, entre outras.

Além da produção no processo de digestão, esses peptídeos podem ser formados no processamento de alimentos proteicos, incluindo hidrólise enzimática utilizando enzimas de origem fúngica, bacteriana e vegetal (KENT *et al.*, 2012). As proteínas do soro, como β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, imunoglobulina, lactoperoxidase, lisozima e lactoferrina, incluindo glicomacropéptídeos do soro de queijo, vêm sendo reconhecidas como fonte desses peptídeos (ALMAAS *et al.*, 2011; RAIKOS *et al.*, 2014).

A propriedade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ACE) recebe ampla atenção devido aos potenciais efeitos benéficos no tratamento da hipertensão. A ACE é uma metalopeptidase que atua no sistema renina-angiotensina-aldosterona transformando angiotensina I em angiotensina II, um potente vasoconstrictor, e catalisa a degradação da bradicinina, um nanopeptídeo com propriedade hipotensora. Dessa forma, a inibição dessa enzima pode resultar na diminuição da pressão arterial (ESPEJO-CARPIO *et al.*, 2013).

Estudos evidenciam a liberação de peptídeos inibidores da ACE de frações proteicas do soro de cabra. Na pesquisa realizada por Espejo-Carpio *et al.* (2013), a atividade de proteases comerciais sobre as proteínas do soro produziu peptídeos ativos inibidores da ACE. Em outros estudos, a fermentação do soro caprino por micro-organismos, incluindo

Lactobacillus paracasei, resultou na formação de peptídeos com ação inibitória da ACE, sendo três identificados como originários da α -lactoalbumina (DIDELOT *et al.*, 2006; HAMMÉ *et al.*, 2009).

Peptídeos derivados de proteínas do soro podem contribuir para os efeitos anti-obesidade, como descrito por Zemel *et al.* (2005). Hammé *et al.* (2010) constataram *in vitro* que peptídeos ativos em soro lácteo de cabra fermentado induziram retardo na adipogênese e redução do conteúdo lipídico de adipócitos humanos.

Algumas pesquisas detectaram peptídeos derivados de proteínas do soro com atividade antimicrobiana contra várias cepas bacterianas, incluindo espécies patogênicas. Almaas *et al.* (2011) detectaram *in vitro* a presença de peptídeos antibacterianos produzidos no soro caprino após hidrólise por proteases gastrointestinais humanas. Os peptídeos obtidos exerceram forte atividade contra os patógenos *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, e foram inativos contra o probiótico *Lactobacillus rhamnosus*.

Nas últimas décadas, pesquisas *in vitro* descobriram peptídeos com capacidade moduladora na ativação e proliferação de linfócitos. Eriksen *et al.* (2008) pesquisou sobre a atividade moduladora de peptídeos derivados do soro de queijo de cabra sobre células mononucleares periféricas do sangue humano. Os peptídeos apresentaram potencial de inibição dose-dependente dessas células, através de mecanismo ainda não elucidado, sendo sugerido que as frações proteicas afetam a produção de sinais de ativação envolvidos na proliferação de linfócitos.

Sendo o soro uma importante fonte de proteínas que servem de substrato para produção de peptídeos bioativos e considerando as diversas modulações fisiológicas realizadas por estas moléculas, esse subproduto da fabricação de queijos possui grande potencial para ser utilizado no desenvolvimento de produtos lácteos funcionais.

3.4 Secagem do soro lácteo em *spray dryer*

Spray drying (ou secagem por atomização) é o método mais utilizado pela indústria de alimentos para conversão de produtos líquidos a forma de pó, sendo amplamente utilizado na produção de produtos lácteos. Nesse processo de secagem, o líquido é atomizado e entra em contato com o ar ou gás em temperatura elevada, de forma que o conteúdo aquoso é evaporado, dando origem a partículas secas (ANANDHARAMAKRISHNAN *et al.*, 2008).

Essa técnica de secagem pode exercer impacto sobre os constituintes do soro e, como indicam alguns estudos, pode resultar principalmente na desnaturação parcial das proteínas.

No entanto, diversas pesquisas investigaram a otimização desse processamento térmico, visando a preservação dos seus aspectos funcionais, melhor rendimento dos constituintes e menor desnaturação das proteínas do soro (ANANDHARAMAKRISHNAN *et al.*, 2007; ANANDHARAMAKRISHNAN *et al.*, 2008; PATEL e CHEN, 2008; DISSANAYAKE e VASILJEVIC, 2009; PESCUMA *et al.*, 2010; KESHANI *et al.*, 2013).

Apesar de ter efeito sobre os constituintes, a secagem em *spray dryer* constitui uma alternativa viável para estender a vida de prateleira de produtos lácteos em geral, especialmente por convertê-los em pó sem alterar significativamente suas características sensoriais (REDDY *et al.*, 2014).

3.5 Proteínas e peptídeos do leite e do soro: metodologias de avaliação

Church *et al.* (1983) desenvolveram o ensaio colorimétrico *o*-ftaldialeído (OPA), um método rápido e sensível para determinação da proteólise de produtos lácteos. Pescuma *et al.* (2012) empregaram a mesma metodologia no estudo da degradação proteica por bactérias lácticas em soro reconstituído.

Várias pesquisas utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) para detecção, isolamento e/ou caracterização de proteínas nativas do soro lácteo. Torre *et al.* (1996) desenvolveram um método para a separação das principais proteínas do soro, incluindo α -lactoalbumina, albumina sérica e β -lactoglobulina por RP-HPLC. No soro lácteo caprino, essa tecnologia pode ser utilizada na determinação da concentração das proteínas (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina) após tratamento térmico e na avaliação da proteólise exercida por enzimas naturais ou por micro-organismos probióticos (SANTILLO *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ-LEDESMA *et al.*, 2011; MADUREIRA *et al.*, 2012; DUMITRASCU *et al.*, 2013).

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção do soro de queijo de cabra *in natura* e atomizado (em pó)

Para o presente projeto foram fornecidos, pela Embrapa Caprinos e Ovinos (Sobral, CE), lotes de soro de queijo de cabra, sendo estes de dois tipos: soro fluido *in natura* congelado (não tratado termicamente) e soro seco em *spray dryer*. O soro *in natura* foi obtido a partir do processamento de 13 lotes de queijo tipo coalho de cabra. O soro atomizado foi obtido a partir do processamento de 10 diferentes lotes de queijo tipo coalho de cabra seco em mini-atomizador Büchi, modelo B-290 (Büchi, Flawil, Suíça), operando em uma velocidade de bombeamento de 25 ml/min., uma temperatura de entrada de 160 °C e de saída de 92 °C.

4.2 Composição centesimal do soro de queijo de cabra atomizado

4.2.1 Determinação do teor de sólidos totais (*extrato seco total*) e umidade

A determinação do teor de sólidos totais e de umidade foi realizada em triplicata para as amostras de soro atomizado em pó a partir de secagem de 2 g de produto em estufa Tecnal modelo TE 393/2 (Piracicaba, Brasil) a 105 °C, de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008), método 012/IV. Para as amostras de soro *in natura* esses parâmetros foram determinados a partir da secagem de 2 g do produto em estufa à vácuo Marconi modelo MA 030/12 (Piracicaba, Brasil) a 70 °C, segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008), método 013/IV.

4.2.2 Determinação do teor de cinzas (*resíduo mineral fixo*)

A análise do teor de cinzas foi realizada gravimetricamente a partir da incineração do extrato seco das amostras obtidas da análise de umidade (item 4.2.1) de soro fluido *in natura* e soro atomizado em pó, em triplicata, a 550 °C em mufla Fornitec No. 3475 (Fornitec Ind e Com. Ltda., São Paulo, Brasil) até a queima completa da matéria orgânica, segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008), método 018/IV.

4.2.3. Determinação do teor de gordura (lipídeos)

Para a quantificação de lipídeos nas amostras de soro de queijo de cabra *in natura* e atomizado, foi utilizado o método de lactobutirômetro Gerber, segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008), método 433/IV. Ambas as amostras foram analisadas em triplicata.

4.2.4 Determinação do teor de proteínas totais

O método micro-Kjeldahl foi utilizado para a determinação do teor de nitrogênio das amostras de soro de queijo de cabra fluido *in natura* e de soro atomizado a partir de alíquotas de 0,2 g, em triplicata. Para a conversão do teor de nitrogênio em teor proteico, foi utilizado o fator 6,38 (AOAC INTERNATIONAL, 2003).

4.2.5 Determinação do teor de carboidratos totais

A estimativa do teor de carboidratos totais foi obtida por diferença a partir da análise prévia individual dos teores de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas das amostras de soro fluido *in natura* e soro atomizado em pó, somados e subtraídos da amostra total (FAO, 2003), conforme apresentado na equação (1):

$$\text{Carboidratos totais (g/100 g)} = 100 - [\text{umidade} + \text{cinzas} + \text{lipídeos} + \text{proteínas}] \quad (1)$$

onde os valores de carboidratos totais, umidade, cinzas, lipídios e proteínas são fornecidos em g/100 g de amostra em base úmida.

4.3 Fermentação do soro lácteo reconstituído

O soro de queijo de cabra atomizado em pó foi reconstituído em água destilada (20%, m/m) de modo que apresentasse uma proporção mínima de 2 g de proteína/100 g (reconstituição do soro estabelecida com base na determinação prévia do teor proteico das amostras de soro em pó). Em seguida, o soro reconstituído foi tratado termicamente a 85 °C por um período de 30 minutos e resfriado a 45 °C para adição das culturas lácticas. As

culturas utilizadas para as formulações foram: *Streptococcus thermophilus* TA40 (Dupont), *Lactobacillus casei* BGP93 (Sacco) e *Lactobacillus paracasei* BGP1 (Sacco).

Duas formulações (Formulação 1 - F1 e Formulação 2 - F2) foram produzidas utilizando o soro lácteo reconstituído. Cada formulação foi adicionada de um micro-organismo adjuvante potencialmente probiótico em combinação com um micro-organismo *starter*, cujas proporções e culturas utilizadas são especificadas na **Tabela 1**. Depois de adicionado das culturas lácteas, o soro reconstituído foi incubado a 45 °C em estufa de incubação microprocessada. Para cada formulação, um total de quatro lotes foram produzidos.

Tabela 1 – Cepas e proporções dos micro-organismos utilizados para cada formulação

Tratamento	Micro-organismos	Cepas (proporção)
F1	<i>L. casei</i> BGP93 + <i>S. thermophilus</i> TA40	20 mg/100 g + 3 mg/100 g
F2	<i>L. paracasei</i> BGP1 + <i>S. thermophilus</i> TA40	20 mg/100 g + 3 mg/100 g

LEGENDA: F1 = Formulação 1; F2 = Formulação 2.

FONTE: Dados de pesquisa.

4.4 Avaliação das características físico-químicas e da viabilidade dos micro-organismos *starter* e probióticos no soro reconstituído fermentado

4.4.1 pH e acidez titulável

Ao longo da fermentação, foram monitorados os parâmetros de pH e acidez titulável, métodos 017/IV e 016/IV, de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). A medição de pH foi utilizada como controle do processo de fermentação, de forma que, quando o soro em pó reconstituído atingiu a faixa de pH de $4,95 \pm 0,10$, a incubação foi finalizada. Estes parâmetros também foram avaliados após 1 e 7 dias de armazenamento do produto final sob refrigeração a 4 °C.

4.4.2 Determinação das populações de *S. thermophilus*, *L. casei* e *L. paracasei*

Os micro-organismos probióticos e *starter* foram avaliados no soro reconstituído no início (tempo inicial - TI) e no término da fermentação (tempo final - TF) e após um e sete dias (D1 e D7, respectivamente) de armazenamento sob refrigeração a 4 °C. As populações de

S. thermophilus (*starter*) e dos micro-organismos potencialmente probióticos (*L. casei* e *L. paracasei*) foram determinadas por cultivo em meios de cultura. A população de *S. thermophilus* foi determinada por plaqueamento, em profundidade, de diluições seriadas dos soros reconstituídos fermentados em placas adicionadas de ágar M17 contendo lactose, segundo o método descrito por Richter e Vedamuthu (2001), e incubadas em aerobiose a 35-37 °C por 48 horas. A determinação de *L. casei* e *L. paracasei* ocorreu em ágar De Mann Rogosa Sharpe (MRS) acidificado com ácido acético até pH 5,4, conforme o método descrito por Oliveira *et al.* (2001) e por Buriti *et al.* (2007), e incubadas em aerobiose a 35-37 °C por 72 horas para a formulação contendo *L. casei* (F1) e por 48 horas para a formulação contendo *L. paracasei* (F2).

4.5 Avaliação do efeito dos processamentos sobre as proteínas do soro

4.5.1 Determinação de proteínas totais

O método micro-Kjeldahl foi utilizado para a quantificação de proteínas nas amostras de soro reconstituído no início (tempo inicial - TI) e no término da fermentação (tempo final - TF) e após um e sete dias (D1 e D7, respectivamente), nas duas formulações (F1 e F2). Para a conversão do teor de nitrogênio em teor proteico, foi utilizado o fator 6,38 (AOAC INTERNATIONAL, 2003). A determinação do teor de proteínas foi realizada em duplicata para cada tratamento e os resultados foram utilizados na determinação do grau relativo de proteólise (**item 4.5.2**).

4.5.2 Determinação do grau de proteólise

Para fins de avaliação do efeito da fermentação sobre as proteínas do soro, o grau de proteólise foi determinado pela quantificação de grupos NH₃ livres utilizando o método *o*-fitaldialdeído (OPA), adaptado de Church *et al.* (1983). Em uma alíquota de 250 µL da amostra de soro foram adicionados 50 µL de água destilada e 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,75 N. A suspensão obtida foi agitada em vórtex por 1 min, deixada em repouso por 15 min e submetida à centrifugação, em temperatura ambiente, à 13.000 × g /15 min. Uma alíquota de 100 µL da solução de peptídeos solúveis em TCA (sobrenadante) foi adicionada de 2 ml do reagente OPA e após 2 minutos em temperatura ambiente (25 °C) foi realizada a medida da absorbância em espectrofotômetro UV (comprimento de onda 340 nm). Foram

analisadas, em duplicata, as amostras de soro reconstituído sem a adição de micro-organismos (SR), de soro reconstituído adicionado de bactérias *starter* e probióticas (F1 e F2) nos tempos iniciais e finais de fermentação (TI e TF, respectivamente) e após um e sete dias de armazenamento (D1 e D7, respectivamente). O grau relativo de proteólise obtido através da atividade proteolítica específica por miligrama de proteína sobre o soro reconstituído (U/mg) foi determinado conforme a equação (2) a seguir:.

$$U / mg \text{ proteína} = \frac{(ABS_a - ABS_r) \times 1000}{P} \quad (2),$$

onde ABS_a é a absorbância do soro reconstituído adicionado de micro-organismo nos diferentes tempos de análise (TI, TF, D1 e D7), ABS_r é a absorbância da amostra de referência (soro reconstituído sem a adição de micro-organismos) e P é a concentração de proteínas das amostras em mg/g.

4.5.3 Análise em cromatografia líquida ultrarrápida em fase reversa (RP-UFLC)

As amostras de soro *in natura*, de soro reconstituído adicionado da cultura *starter* e das bactérias probióticas (F1 e F2) nos tempos iniciais e finais de fermentação (TI e TF, respectivamente) e após um e sete dias de armazenamento (D1 e D7, respectivamente), receberam tratamento prévio para extração dos peptídeos solúveis em água seguindo a metodologia adaptada de Donkor *et al.* (2007). Alíquotas de 5 mL das amostras de soro tiveram seu pH ajustado para 4,55 e foram centrifugadas em centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5810R (Hamburgo, Alemanha) a $15.000 \times g$ e à uma temperatura de 4°C por 30 min. O sobrenadante obtido foi filtrado em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de $0,45 \mu\text{m}$.

Os peptídeos solúveis em água foram analisados em Cromatógrafo Líquido Ultrarrápido (UFLC Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com coluna C-18 ($5 \mu\text{m}$, 300 \AA , $50 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$; Phenomenex, Torrence CA, USA), degaseificador modelo DGU2-20_{A3} (Shimadzu), duas bombas LC-20AD (Shimadzu), injetor automático SIL-20A_{HT} (Shimadzu), forno Shimadzu CTO-20A (Shimadzu) e detector UV-Vis modelo SPD-20A (Shimadzu). As amostras foram aplicadas em um volume de injeção de $5 \mu\text{L}$ e eluídas em gradiente linear de 100 a 0% do solvente A (0,1% de ácido trifluoroacético – TFA – em água ultrapurificada) no solvente B (0,1% de TFA e 90% de acetonitrila em água ultrapurificada) durante 6 minutos. A separação foi realizada a uma temperatura de $\pm 27^\circ\text{C}$ e uma razão de fluxo de 1 mL/min foi

empregada. Os peptídeos eluídos foram detectados em UV-vis operando a 214 nm. Todos os solventes foram filtrados em membrana de PVDF com porosidade de 0,45 µm.

4.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados de pH, acidez, viabilidade e proteólise do soro foi realizada empregando-se análise de variância de medidas repetidas (RM - ANOVA) para os dados com homogeneidade de variância, seguida do teste Turkey HSD para identificação dos contrastes (BOWER, 1998a). Os testes não paramétricos equivalentes foram aplicados quando variâncias não-homogêneas foram observadas (BOWER, 1997; 1998b). A homogeneidade dos dados foi previamente verificada utilizando os testes de Cochran e Bartlett. Todos os testes foram realizados utilizando o *software* STATISTICA 9.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição centesimal do soro de queijo de cabra

A umidade das amostras de soro de queijo de cabra atomizado em pó do presente estudo variou de 3,05 g/100 g a 6,86 g/100 g (**Tabela 2**). O teor de sólidos totais nos mesmos lotes variou entre 93,14 g/100 g e 96,95 g/100 g, enquanto que o teor de cinzas permaneceu entre 8,74 g/100 g e 9,97 g/100 g (**Tabela 2**).

Apesar da concentração dos constituintes do soro lácteo variar com diversos fatores, tais como época do ano, tipo de alimentação do animal, estágio de lactação e qualidade do processamento, alguns estudos do soro de queijo caprino demonstraram composição semelhante aos resultados deste estudo. Kehagias *et al.* (2008) utilizaram soro em pó caprino com um teor de umidade de 2,5 g/100 g na formulação de bebidas lácteas. Em um estudo realizado por Sanmartín *et al.* (2012), uma porcentagem semelhante de sólidos (95,38 g/100 g) foi determinada em soro de queijo de cabra obtido por coagulação enzimática.

A gordura foi componente que mais diferiu entre os lotes do produto, apresentando concentrações na faixa de 3,55 a 8,97 g/100 g (**Tabela 2**). Teores lipídicos menores foram determinados em soros lácteos bovinos *in natura* obtidos por coagulação láctica nos estudos de Djuric *et al.* (2004) e Rapetti *et al.* (1995), os quais variaram de 0,2 g/100 g a 0,45 g/100 g. Um teor de gordura mais aproximado aos resultados do presente estudo para o soro fluido, 0,84 g/100 g, foi encontrado por Sanmartín *et al.* (2012). Os mesmos autores quantificaram 5,91 g/100 g de gordura no soro caprino em pó, valor dentro do intervalo dos teores de gordura (3,55 g/100 g a 8,97 g/100 g) determinados nos lotes de soro caprino em pó utilizados no presente estudo (**Tabela 2**).

O teor de proteínas variou entre 9,82 g/100 g a 13,79 g/100 g enquanto que o teor de carboidratos totais por diferença variou de 65,18 g/100 g a 73,73 g/100 g (**Tabela 2**). Teores de proteína de 12,8 g/100 g em soro lácteo bovino em pó e de 0,63 g/100 g em soro lácteo caprino *in natura* foram relatados em estudos de obtenção de diferentes concentrados de proteína do soro (VALDUGA *et al.*, 2006; SANMARTÍN *et al.*, 2012).

Tabela 2 – Composição centesimal das amostras de soro de queijo de cabra atomizado em pó (média ± desvio-padrão)

Amostra	Umidade (g/100 g)	Sólidos totais (g/100 g)	Cinzas (g/100 g)	Lipídeos (g/100 g)	Proteínas (g/ 100 g)	Carboidratos totais (g/100 g)
Lote 1	6,86 ± 0,14	93,14	9,97 ± 0,03	6,00 ± 0,00	9,82 ± 0,22	67,35
Lote 2	3,22 ± 0,25	96,77	9,43 ± 0,06	3,55 ± 0,38	11,28 ± 0,57	72,62
Lote 3	4,17 ± 0,35	95,83	9,78 ± 0,07	4,29 ± 0,00	11,40 ± 0,50	70,35
Lote 4	5,11 ± 0,94	94,89	9,12 ± 0,04	6,80 ± 0,41	13,79 ± 0,25	65,18
Lote 5	4,38 ± 0,38	95,62	8,74 ± 0,04	4,48 ± 0,00	10,97 ± 0,51	71,43
Lote 6	5,01 ± 0,75	94,99	9,19 ± 0,32	8,97 ± 1,49	13,09 ± 0,42	73,73
Lote 7	4,56 ± 0,33	95,44	9,34 ± 0,06	7,49 ± 0,00	11,85 ± 0,31	66,77
Lote 8	4,17 ± 0,13	95,83	9,40 ± 0,10	7,09 ± 0,75	8,58 ± 1,54	70,76
Lote 9	3,05 ± 0,10	96,95	9,58 ± 0,14	7,86 ± 1,16	13,45 ± 0,36	66,05
Lote 10	5,01 ± 0,49	94,99	9,10 ± 0,26	3,99 ± 0,86	12,08 ± 0,45	69,81
Média	4,60 ± 1,10	95,40	9,36 ± 0,37	6,04 ± 1,93	11,56 ± 1,60	68,44
Base Seca	-	100	9,82 ± 0,42	6,38 ± 2,01	12,17 ± 1,74	67,04

FONTE: (dados de pesquisa)

Tabela 3 – Composição do soro lácteo não processado - fluido, *in natura* (média \pm desvio-padrão)

Constituintes	Base úmida	Base Seca
Umidade (g/100 g)	93,11 \pm 0,33	-
Sólidos totais (g/100 g)	6,89 \pm 0,34	100
Cinzas (g/100 g)	0,72 \pm 0,19	10,03 \pm 3,35
Lipídeos (g/100 g)	0,50 \pm 0,17	7,24 \pm 2,40
Proteínas (g/100 g)	1,06 \pm 0,24	15,91 \pm 2,12
Carboidratos por diferença* (g/100 g)	4,61	66,81

LEGENDA: *Food and Agriculture Organization of the United Nations (2003); - = conteúdo ausente.
(FONTE: dados de pesquisa)

No presente trabalho, foi observada uma redução do teor proteico nas amostras de soro em pó, cujos valores em base seca foram reduzidos, em média, de 15,91 g/100 g (*soro in natura*) para 12,17 g/100 g (**Tabela 2** e **Tabela 3**). É possível que, conforme apontam estudos, o emprego de elevadas temperaturas no processo de secagem de soro por *spray drying*, contribuiu para a adesão de partículas nas paredes da câmara, podendo ter resultado na redução de seus constituintes (ANANDHARAMAKRISHNAN *et al.*, 2008; FANG *et al.*, 2012; KESHANI *et al.*, 2013).

Alguns estudos revelam que a temperatura utilizada na secagem em *spray dryer* pode influenciar na desnaturação das proteínas do soro. Anandharamakrishnan *et al.* (2007), em estudo sobre o efeito das variáveis de secagem em *spray dryer* sobre as proteínas do soro, constataram quase uma desnaturação completa a uma temperatura de 120 °C. Sodini *et al.* (2006) verificaram um nível de desnaturação de 10-53% das proteínas do soro.

Mesmo sendo observada uma modificação no teor proteico após o processo de secagem, a tecnologia de secagem em *spray dryer* ainda constitui uma alternativa viável para conservação do soro lácteo caprino. Ainda, é possível que o tratamento térmico resulte em desnaturação parcial das proteínas, o que pode facilitar atividade proteolítica das enzimas bacterianas durante a fermentação. Deve-se avaliar também a considerável redução de volume de amostra proporcionada por tal processo de secagem (que resulta em economia financeira e de espaço para o transporte e armazenamento), além da dispensa do uso de refrigeração ou congelamento para sua conservação (economia energética) desde que estocado em ambiente seco e arejado em embalagem que garanta seu isolamento da luz e oxigênio.

5.2 Caracterização do soro atomizado reconstituído fermentado

5.2.1 Valores de pH e acidez e viabilidade das culturas lácticas no soro reconstituído durante a fermentação e armazenamento

Nas duas formulações produzidas, os valores de pH do soro reconstituído antes da fermentação (TI) variaram entre 5,655-5,664 acompanhada de uma queda significativa ($p < 0,05$) com valores entre 4,926-4,993 no final da fermentação (TF). Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) após um dia (5,063-5,103) e uma pequena queda, porém significativa ($p < 0,05$), após sete dias de armazenamento sob refrigeração (4,950-5,044). Concomitante à redução do pH, os valores de acidez em ácido láctico para os dois tratamentos variaram entre 0,303-0,324 g/ 100 g em TI, com uma elevação significativa ($p < 0,05$) para 0,543-0,606 g/100 g em TF. A acidez em F1 e F2 apresentou estabilidade, sem diferenças significativas ($p > 0,05$) no primeiro (D1) e sétimo (D7) dia de armazenamento. Não houve diferenças significativas entre as formulações com relação aos valores de pH em todos os períodos de amostragem avaliados ($p > 0,05$). Entretanto, os valores de acidez em F1 foram significativamente mais elevados ($p < 0,05$) que em F2 em todos os períodos de amostragem (**Tabela 4**).

A população de *S. thermophilus* aumentou significativamente ($p < 0,05$) durante a fermentação nas duas formulações. Em F1, a população desse micro-organismo teve um decréscimo não significativo ($p > 0,05$) entre o final da fermentação (TF) e o primeiro dia (D1) e um aumento não significativo ($p > 0,05$) no sétimo dia (D7) de armazenamento sob refrigeração à 4 °C. Em F2, observou-se uma estabilidade no número de células viáveis desse micro-organismo, no entanto houve redução significativa ($p < 0,05$), entre D1 e D7 (**Tabela 4**).

Em F1, observou-se um aumento não significativo ($p > 0,05$) da população de *L. casei* durante a fermentação (de 7,152 a 7,330 log UFC/ml) e um pequeno decréscimo não significativo ($p > 0,05$) após 1 dia (7,218 log UFC/ml), acompanhado de uma elevação não significativa ($p > 0,05$) após 7 dias de armazenamento sob refrigeração (**Tabela 4**). A população de *L. paracasei* (F2) aumentou significativamente ($p < 0,05$) durante a fermentação. Durante o período de armazenamento, a população de *L. paracasei* apresentou um aumento, porém não significativo ($p > 0,05$), em D1 e reduziu significativamente ($p < 0,05$) em D7.

Tabela 4 - Valores de pH, acidez titulável e viabilidade dos micro-organismos utilizados na fermentação do soro caprino reconstituído (média \pm desvio-padrão)

Tratamento	Tempo	pH	Acidez (g de ácido lático/100 g)	<i>S. thermophilus</i> (log UFC/ml)	<i>Lactobacillus</i> (log UFC/ml)
F1	TI	5,664 \pm 0,047 ^{Ac}	0,324 \pm 0,034 ^{Ba}	6,468 \pm 0,240 ^{Ba}	7,152 \pm 0,071 ^{Aa}
	TF	4,926 \pm 0,063 ^{Aa}	0,606 \pm 0,042 ^{Bb}	8,786 \pm 0,246 ^{Ac}	7,330 \pm 0,145 ^{Aab}
	D1	5,103 \pm 0,121 ^{Ab}	0,616 \pm 0,053 ^{Bb}	8,722 \pm 0,259 ^{Abc}	7,218 \pm 0,158 ^{Aab}
	D7	4,950 \pm 0,095 ^{Aa}	0,601 \pm 0,028 ^{Bb}	8,616 \pm 0,159 ^{Ab}	7,360 \pm 0,218 ^{Ab}
F2	TI	5,655 \pm 0,011 ^{Ac}	0,303 \pm 0,029 ^{Aa}	5,877 \pm 0,163 ^{Aa}	7,438 \pm 0,119 ^{Ba}
	TF	4,993 \pm 0,057 ^{Aa}	0,543 \pm 0,058 ^{Ab}	8,694 \pm 0,127 ^{Ac}	7,825 \pm 0,174 ^{Bbc}
	D1	5,063 \pm 0,084 ^{Ab}	0,545 \pm 0,024 ^{Ab}	8,752 \pm 0,263 ^{Ac}	8,004 \pm 0,180 ^{Bc}
	D7	5,044 \pm 0,060 ^{Aa}	0,575 \pm 0,027 ^{Ab}	8,476 \pm 0,223 ^{Ab}	7,678 \pm 0,297 ^{Bb}

LEGENDA: F1 = *L. casei* BGP93 + *S. thermophilus* TA40; F2 = *L. paracasei* BGP1 + *S. thermophilus* TA40; TI = tempo inicial (antes da fermentação); TF = tempo final (término da fermentação); D1 = dia 1 (dia seguinte à fermentação); D7 = dia 7 (7 dias após à fermentação). ^{A, B, C} Letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam as diferenças significativas no mesmo tempo de armazenamento entre os tratamentos. ^{a, b, c} Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam as diferenças significativas ao longo do tempo para um mesmo tratamento.

(FONTE: dados de pesquisa)

A maior viabilidade de lactobacilos utilizados como co-cultura durante a fermentação e ao longo do armazenamento foi obtida para a formulação F2, produzida com *L. paracasei* BGP1, aos 7 dias de armazenamento ($p < 0,05$).

O número de células viáveis dos micro-organismos estudados foi semelhante aos encontrados na literatura para soro de queijo e produtos lácteos em geral. No estudo de Madureira *et al.* (2005) foi determinado um número de células viáveis de *L. paracasei* de 7,23 log UFC/ml em soro obtido da produção de requeijão, permanecendo superior 9 log UFC/ml após 21 semanas de armazenamento sob refrigeração. Madureira *et al.* (2011) quantificaram uma população de *L. casei* de 7,80 log UFC/ml em soro de queijo *in natura* adicionado de 10% de leite bovino. No referido estudo, o micro-organismo apresentou uma viabilidade de 9,012 log UFC/ml após 14 dias de armazenamento sob refrigeração.

No presente estudo, durante o período estudado, a viabilidade de *L. casei* BGP93 e *L. paracasei* BGP1 em F1 e F2, respectivamente, obedeceu aos critérios nacionais para alimentos probióticos, mantendo-se acima de 9 log UFC na porção de 200 ml utilizada para bebidas lácteas, sendo que o valor mínimo estabelecido encontra-se entre 8 e 9 log UFC do micro-organismo probiótico na porção de produto pronto para o consumo (ANVISA, 2003; 2008).

5.3 Avaliação do efeito dos processamentos sobre as proteínas do soro lácteo caprino

5.3.1 Avaliação da atividade proteolítica (grau de proteólise)

As amostras de soro em pó foram reconstituídas de forma a apresentarem uma proporção de, no mínimo, 2 g de proteína/100 g de soro reconstituído, para então serem adicionadas das culturas lácticas. Dessa forma, o conteúdo de proteínas totais nas amostras de soro fermentado permaneceu entre 2,509 e 2,906 g/100 g, não sendo observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) (**Tabela 6**).

Tabela 5 – Proteínas totais (g/100 g) e atividade proteolítica específica (U/mg de proteína) nas amostras de soro caprino reconstituído fermentado com culturas lácticas probióticas (média \pm desvio-padrão)

	Tratamento	Tempo			
		TI	TF	D1	D7
PT (g/100g)	F1	2,906 \pm 0,316 ^{Aa}	2,702 \pm 0,331 ^{Aa}	2,800 \pm 0,428 ^{Aa}	2,592 \pm 0,368 ^{Aa}
	F2	2,633 \pm 0,187 ^{Aa}	2,570 \pm 0,075 ^{Aa}	2,570 \pm 0,297 ^{Aa}	2,509 \pm 0,222 ^{Aa}
APE (U/mg)	F1	0,271 \pm 0,85 ^{Aa}	6,661 \pm 1,95 ^{Ab}	7,145 \pm 0,65 ^{Ab}	7,757 \pm 2,26 ^{Ab}
	F2	0,535 \pm 1,39 ^{Aa}	5,667 \pm 2,60 ^{Ab}	5,026 \pm 1,55 ^{Ab}	5,364 \pm 3,60 ^{Ab}

LEGENDA: PT = proteínas totais; APE = atividade proteolítica específica; F1 = *L. casei* BGP93 + *S. thermophilus* TA40; F2 = *L. paracasei* BGP1 + *S. thermophilus* TA40; TI = tempo inicial (antes da fermentação); TF = tempo final (término da fermentação); D1 = dia 1 (dia seguinte à fermentação); D7 = dia 7 (7 dias após à fermentação). ^A Letras maiúsculas sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre os tratamentos em um mesmo tempo de amostragem. ^{ab} Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma linha não diferem significativamente ao longo do tempo para um mesmo tratamento. (FONTE: dados de pesquisa)

No tempo inicial de fermentação (TI) obteve-se uma atividade proteolítica específica (grau de proteólise) de 0,271 U/mg e 0,535 U/mg em F1 e F2, respectivamente, aumentando significativamente para 5,667 – 6,661 U/mg em TF ($p < 0,05$). Em F2 houve um pequeno decréscimo no grau de proteólise após 1 dia de armazenamento, porém não significativo ($p > 0,05$). No geral, o grau de proteólise permaneceu estável durante 1 e 7 dias de armazenamento, não havendo aumento ou decréscimo significativo ($p > 0,05$) (**Tabela 6**). Portanto, constatou-se que os probióticos exercem atividade proteolítica sobre o soro caprino principalmente durante o período de fermentação (TI – TF).

A maior atividade proteolítica, observada desde o momento da adição dos micro-organismos antes da fermentação (TI) até o sétimo dia de armazenamento sob refrigeração

(D7), foi obtida em F1 (*L. casei* + *S. thermophilus*), porém sem diferenças significativas ($p > 0,05$) da formulação F2 (*L. paracasei* + *S. thermophilus*).

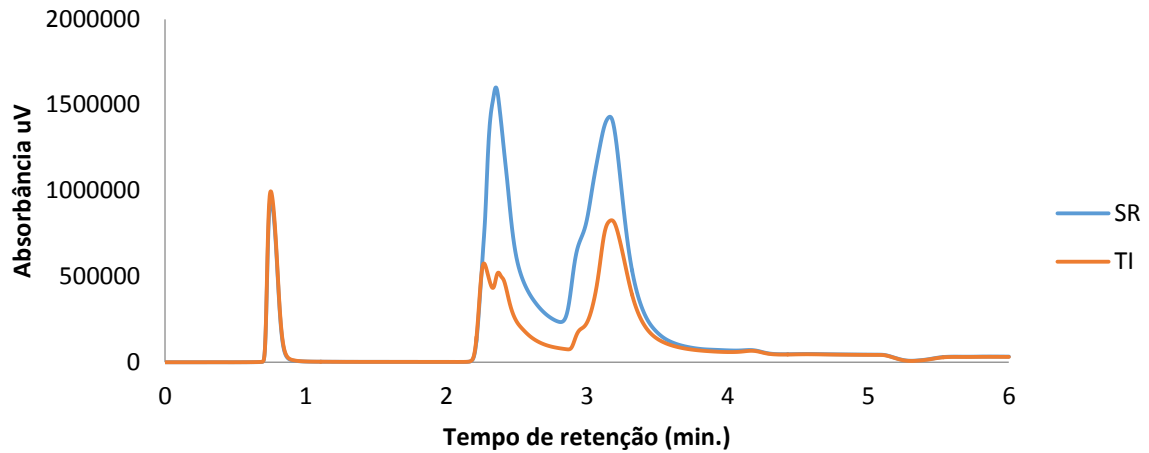
Donkor *et al.* (2007), investigaram a atividade proteolítica de micro-organismos *starters* e probióticos, incluindo *S. thermophilus* e *L. casei*, na produção de iogurte fermentado. Foi verificado um aumento significativo na liberação de grupamentos NH_3 livres no primeiro dia e uma elevação razoável durante 30 dias de armazenamento sob refrigeração a 4° C. Sah *et al.* (2014) quantificaram um grau de proteólise de 5,38 a 11,91% em diferentes formulações de iogurtes probióticos, utilizando os micro-organismos *S. thermophilus*, *L. casei* e *L. paracasei*. Os dois estudos citados utilizaram o leite *in natura* nas respectivas formulações de bebidas lácteas, produto que apresenta a caseína como proteína majoritária. Considerando que o soro apresenta constituição proteica distinta, o perfil dos peptídeos formados provavelmente difere dos produzidos no presente estudo.

Na produção de uma bebida funcional a base de soro bovino fermentada com bactérias lácticas, Pescuma *et al.* (2010) avaliaram a atividade proteolítica de *S. thermophilus* e não constatou diferença na concentração de grupos NH_3 livres durante 24 horas de incubação a 37° C. Em outro estudo, Pescuma *et al.* (2012) avaliaram o nível de degradação proteica de cepas de *S. thermophilus*, *L. casei* e *L. paracasei* em soro reconstituído. As cepas de *L. casei* e *L. paracasei* estudadas demonstraram aumento na atividade proteolítica durante 24 horas de incubação a 37 °C, enquanto que os valores de proteólise das cepas de *S. thermophilus* não apresentaram diferenças durante nesse mesmo período. Embasado por esses estudos, ressalta-se a importância da utilização de micro-organismos probióticos adjuvantes, tais como *L. casei* e *L. paracasei*, para se promover a hidrólise das proteínas do soro e a possível produção de peptídeos com atividade biológica, visto que o micro-organismo *starter* não exerce proteólise.

5.3.2 Análise em cromatografia líquida ultrarrápida em fase reversa (RP-UFLC)

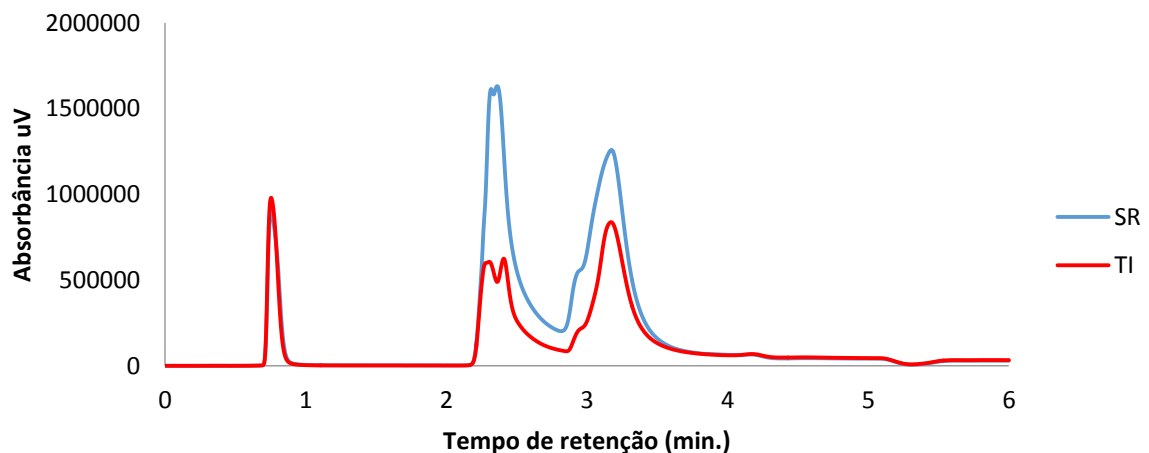
Qualitativamente, os lotes de soro em pó reconstituído sem tratamento (SR) e adicionados de culturas lácticas (F1 e F2) apresentaram perfis de eluição similares (**Figuras 1 a 6**). As amostras de SR apresentaram picos maiores em relação a F1 e F2 durante os períodos de amostragem estudados (TI, TF, D1 e D7).

Figura 1 - Cromatograma do soro reconstituído sem culturas lácticas (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 (F1) no tempo inicial da fermentação (TI)



Legenda: SR – soro reconstituído sem culturas lácticas; F1 – Formulação 1 (*S. thermophilus* TA40 + *L. casei* BGP93); TI – tempo inicial de fermentação.
(FONTE: dados de pesquisa)

Figura 2 - Cromatograma do soro reconstituído sem culturas lácticas (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. paracasei* BGP1 (F2) no tempo inicial da fermentação (TI)

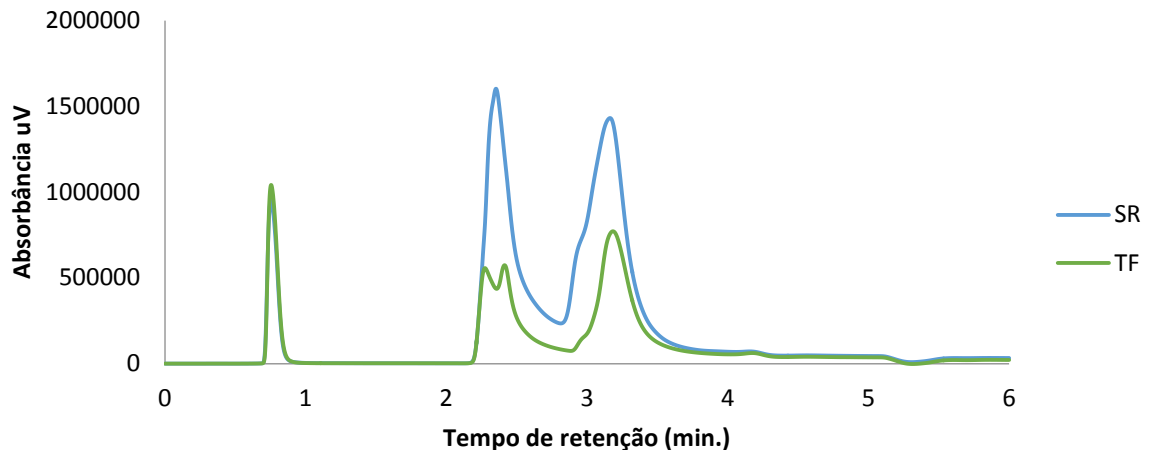


Legenda: SR – soro reconstituído sem tratamento; F2 – Formulação 2 (*S. thermophilus* TA40 + *L. paracasei* BGP1); TI- tempo inicial de fermentação;
(FONTE: dados de pesquisa)

Nas duas formulações, observa-se que a amostra de soro antes da fermentação (TI) difere em relação ao soro reconstituído (SR), por diminuição dos picos (**Figura 1 e 2**). Conforme citado na metodologia, o soro reconstituído passou por um tratamento térmico (85 °C/30 min.) antes de ser adicionado das culturas lácticas. Considerando que os microorganismos estudados não possuem atividade proteolítica imediata, é possível que essa diminuição seja explicada pela desnaturação proteica causada pelo processamento térmico,

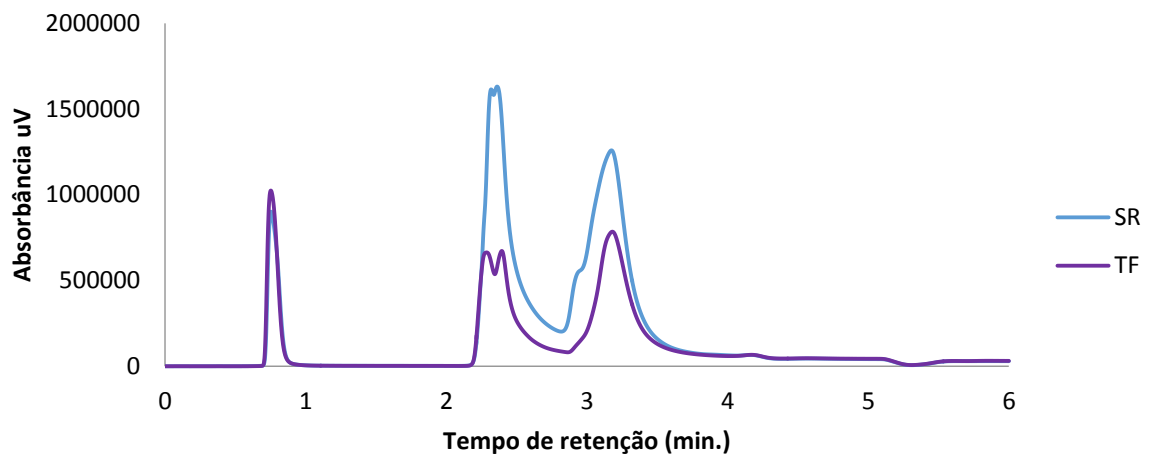
que pode levar a uma modificação na solubilidade das proteínas, tendo um impacto sobre o perfil de peptídeos solúveis em TI.

Figura 3 - Cromatograma do soro reconstituído sem culturas lácticas (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 (F1) no tempo final da fermentação (TF)



Legenda: SR – soro reconstituído sem tratamento; F1 – Formulação 1 (*S. thermophilus* TA40 + *L. casei* BGP93); TF- tempo final de fermentação;
(FONTE: dados de pesquisa)

Figura 4 - Cromatograma do soro reconstituído sem culturas lácticas (SR) e adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. paracasei* BGP1 (F2) no tempo final da fermentação (TF)

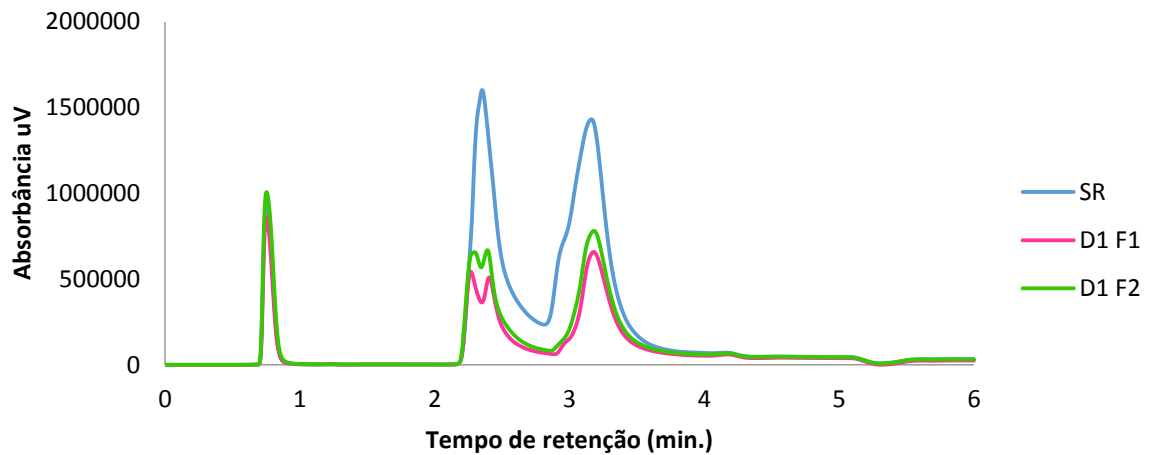


Legenda: SR – soro reconstituído ; F2 – Formulação 2 (*S. thermophilus* TA40 + *L. paracasei* BGP1); TF- tempo final de fermentação;
(FONTE: dados de pesquisa)

A desnaturação das proteínas do soro lácteo caprino ocasionada por aquecimento já foi estudada por Pintado e Malcata (1996) que, utilizando a técnica de cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC), identificou que o aquecimento de soro ácido em temperatura superior a 85 °C resultou na desnaturação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, tendo

impacto direto na solubilidade dessas proteínas. Dumitrascu *et al.* (2013), utilizando metodologia parecida, constataram que o aumento do tempo e temperatura de aquecimento do leite de cabra ocasionava maior decréscimo das proteínas majoritárias do soro.

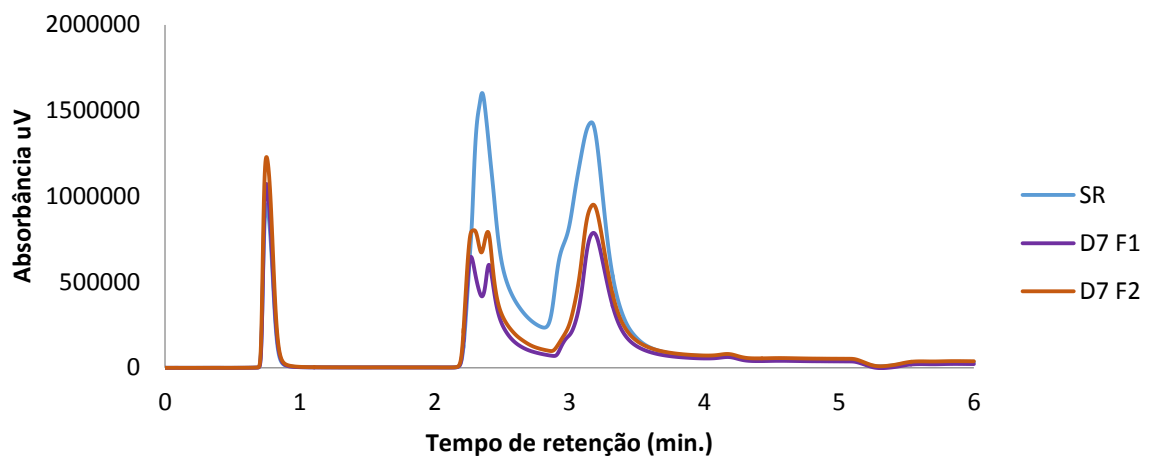
Figura 5 - Cromatograma do soro reconstituído sem culturas lácticas (SR) e das duas formulações de soro reconstituído (F1 e F2) após 1 dia de armazenamento (D1)



Legenda: SR – soro reconstituído (valores médios dos soros utilizados para a produção de F1 e F2); D1 F1- Soro reconstituído adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 após 1 dia de armazenamento sob refrigeração a 4 °C; D1 F2 – Soro reconstituído adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. paracasei* BGP1 após 1 dia de armazenamento sob refrigeração a 4 °C.

(FONTE: dados de pesquisa)

Figura 6 - Cromatograma do soro reconstituído sem culturas lácticas (SR) e das duas formulações de soro reconstituído (F1 e F2) após 7 dias de armazenamento (D7)



Legenda: SR – soro reconstituído (valores médios dos soros utilizados para a produção de F1 e F2); D7 F1- Soro reconstituído adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. casei* BGP93 após 7 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 °C; D7 F2 – Soro reconstituído adicionado de *S. thermophilus* TA40 e *L. paracasei* BGP1 após 7 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 °C.

(FONTE: dados de pesquisa)

Os cromatogramas das amostras dos dois tratamentos durante TF, D1 e D7 também tiveram picos menores em relação ao SR (**Figuras 3, 4, 5 e 6**). Considerando que pelo método OPA foi detectado um aumento da proteólise durante esse período, é possível que essa diminuição da retenção das proteínas seja decorrente da hidrólise enzimática exercida pelos micro-organismos. Madureira *et al.* (2012), utilizando RP-HPLC, conseguiram detectar, por RP-HPLC, decréscimo no nível das proteínas majoritárias do soro induzida por hidrólise de bactérias lácticas. No entanto, para confirmação e avaliação dos produtos da degradação proteica mediada pelas bactérias probióticas sugere-se modificações nos parâmetros cromatográficos, em especial nos gradientes de eluição, focando apenas na análise das amostras no final da fermentação (TF) e após 1 e 7 dias de armazenamento (D1 e D7).

6 CONCLUSÃO

A secagem em *spray dryer* resultou em poucas modificações na composição centesimal do soro de queijo de coalho de cabra, observando-se uma pequena redução na concentração de proteínas totais quando comparado ao teor desse nutriente nos sólidos totais do soro fluido *in natura*.

A viabilidade das culturas lácticas comerciais potencialmente probióticas de *L. casei* e *L. paracasei* manteve-se dentro dos padrões exigidos pela legislação vigente (acima de 8 log UFC na porção de 200 ml) ao longo do período de armazenamento estudado de 7 dias sob refrigeração (4 °C). Dessa forma, a utilização desses microrganismos em co-cultura com *S. thermophilus* para a fermentação do soro caprino em pó reconstituído mostrou-se viável.

Os micro-organismos estudados apresentaram uma atividade proteolítica apreciável sobre as proteínas do soro de queijo de cabra, sendo constatado um aumento no grau de proteólise no produto após a fermentação e armazenamento. A análise qualitativa dos dados obtidos por cromatografia líquida ultrarrápida em fase reversa (RP-UFLC) apontou uma diminuição nas frações proteicas do soro caprino após a secagem por *spray dryer*, após a fermentação com micro-organismos probióticos e durante armazenamento por 7 dias. A atividade proteolítica observada durante a fermentação do soro reconstituído pode favorecer as chances de liberação no produto de peptídeos com atividade biológica benéfica para saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS

AGENCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução n° 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, n° 231-E, seção 1, p. 23-24, 03 de dez. 1999.

AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC n° 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. **Diário Oficial da União**. Brasília, n° 251, seção 1, p. 28-32, 26 de dez. 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Atualizado em julho, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em 21 de nov. de 2014.

ALMAAS, H.; ERIKSEN, E.; SEKSE, C.; COMI, I.; FLENGSRUD, R.; HOLM, H.; JENSEN, E.; JACOBSEN, M.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G. E. Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 896-905, 2011.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; RIELLY, C. D.; STAPLEY, A. G. F. Effects of process variables on the denaturation of whey proteins during spray drying. **Drying Technology**, v. 25, p. 799-807, 2007.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; RIELLY, C. D.; STAPLEY, A. G. F. Loss of solubility of α -lactalbumin and β -lactoglobulin during the spray drying of whey proteins. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 270-277, 2008.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis**. 17.ed, 2.rev. Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 2003. 2v.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS DE QUEIJO (ABIQ). **Avanços e perspectivas da indústria brasileira de queijos**. Atualizado em abril, 2012. Disponível em: http://www.abiq.com.br/imprensa_ler.asp?codigo=1003&codigo_categoria=2&codigo_subcategoria=17. Acesso em 21 de nov de 2014.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V: ANOVA and multiple comparisons (part B). **Nutrition and Food Science**, v.28, n.1, p.41-48, 1998a.

BOWER, J.A. Statistics for food science – V part C: non-parametric ANOVA. **Nutrition and Food Science**, v.28, n.2, p.102-108, 1998b.

BOWER, J.A. Statistics for food science IV: two sample tests. **Nutrition and Food Science**, v.27, n.1, p.39-43, 1997.

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; FILISETTI, T.M.C.C.; SAAD, S.M.I. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**, v. 104, p.1605-1610, 2007.

CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B.; Incorporation of fruit flours into fermented milk: acidification profile, viability of probiotics and gastrointestinal tolerance. **International Dairy Journal**, v. 41, p. 1-6, 2015.

CHURCH, F. C.; SWAISGOOD, H. E.; PORTER, D. H.; CATIGNANI, G. L. Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 1219–1227, 1983.

CHURCHWARD-VENNE, T. A.; BURD, N. A.; MITCHELL, C. J.; WEST, D. W. D.; PHILP, A.; MARCOTTE, G. R.; BAKER, S. K.; BAAR, K.; PHILLIPS, S. M. Supplementation of a suboptimal protein dose with leucine or essential amino acids: effects of myofibrillar protein synthesis at rest and following resistance exercise in men. **Journal of Physiology**, v. 590, n. 11, p. 2751-2765, 2012.

DIDELOT, S.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S.; ROSENFELD, E.; FRUITIER-ARNAUDIN, I.; PIOT, J.M.; SANNIER, F. Preparation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory hydrolysates from unsupplemented caprine whey fermentation by various cheese microflora. **International Dairy Journal**, v. 16, 976-983, 2006.

DISSANAYAKE, M.; VASILJEVIC, T. Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1387-1397, 2009.

DJURIC, M.; CARIC, M.; MILANOVIC, S.; TEKIC, M.; PANIC, M. Development of whey-based beverages. **European Food Research and Technology**, v. 219, p. 321-328, 2004.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; SINGH, T. K.; VASILJEVIC, T.; SAH, N. P. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1321-1331, 2007.

DUMITRASCU, L.; MOSCHOPOULOU, E.; APRODU, I.; STANCIU, S.; RÂPEANU, G.; STANCIUC, N. Assessing the heat induced changes in major cow and non-cow whey

proteins conformation on kinetic and thermodynamic basis. **Small Ruminant Research**, v. 111, p. 129-138, 2013.

ERIKSEN, E. K.; VEGARUD, G. E.; LANGSRUD, T.; ALMAAS, H.; LEA, T. Effect of milk proteins and their hydrolysates on *in vitro* immune responses. **Small Ruminant Research**, v. 79. P. 29-37, 2008.

ESPEJO-CARPIO, F. J.; GOBBA, C. D.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M.; OTTE, J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. **International Dairy Journal**, v. 32, p. 175-183, 2013.

FANG, Y.; ROGERS, S.; SELOMULYA, C.; CHEN, X. D. Functionality of milk protein concentrate: Effect of spray drying temperature. **Biochemical Engineering Journal**, v. 62, p. 101-105, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Food energy: methods of analysis and conversion factors - report of a technical workshop**. Rome: FAO, 2003. 87 p. [FAO Food and Nutrition Paper 77].

HAMMÉ, V.; SANNIER, F.; PIOT, J.M.; BORDENAVE-JUCHEREAU. Goat whey fermentation by *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus rhamnosus* release tryptophan and tryptophan-lactokinins from a cryptic zone of alpha-lactalbumin. **Journal of Dairy Research**, v. 76, p. 379-383, 2009.

HAMMÉ, V.; SANNIER, F.; PIOT, J.M.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S. Effects of lactokinins from fermented acid goat whey on lipid content and adipogenesis of immortalized human adipocytes. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 642-645, 2010.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M. M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 166, p. 23-35, 2011.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; GARCÍA-NEBOT, M. J.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; AMIGO, L.; RECIO, I. Dairy protein hydrolysates: peptides for health benefits. **International Dairy Journal**, v. 38, p. 82-100, 2014.

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 & Metabolism**, v. 7, p. 51-62, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 1.ed digital. São Paulo: IAL, 2008. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=0&func=select&orderby=1. Acessado em: 22 nov 2014.

KENT, R. M.; GUINANE, C. M.; O'CONNOR, P. M.; FITZGERALD, G. F.; HILL, C.; STANTON, C.; ROSS, R.P. Production of the antimicrobial peptides Caseicin A and B by *Bacillus* isolates growing on sodium caseinate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 55, p. 141-148, 2012.

KEHAGIAS, C.; CSAPÓ, J; KONTELES, S.; KOLOKITHA, E.; KOULOURIS, S.; CSAPÓ-KISS, Z. Support of growth and formation of D-amino acids by *Bifidobacterium longum* in cows', ewes', goats' milk and modified whey powder products. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 396-402, 2008.

KESHANI, S.; DAUD, W. R. W.; WOO, M. W.; NOUROUZI, M. M.; TALIB, M. Z. M.; CHUAH, A. L.; RUSSLY, A. R. Reducing the deposition of fat and protein covered particles with low energy surface. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 737-748, 2013.

KORPELA, R.; LOUHELAINEN, M; MERVAALA, E.; PILVI, T. K.; STORVIK, M. High calcium diet with whey proteins attenuates weight gain and alters adipose tissue gene expression in a modelo of diet induced obesity. **International Journal of Obesity**, v. 32, p. S15, 2008.

LEKSRISOMPONG, P. P.; MIRACLE, R. E.; DRAKE, M. Characterization of flavor of whey protein hydrolysates. **Journal of Agricutal and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6318-6327, 2010.

MADUREIRA, A. R.; GIÃO, M. S.; PINTADO, M. E.; GOMES, A. M. P.; FREITAS, A. C.; MALCATA, X. Incorporation and survival of probiotic bactéria in whey cheese matrices. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 3, p. 160-165, 2005.

MADUREIRA, A. R.; BRANDÃO, T.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, X. Technological optimization of manufacture of probiotic whey cheese matrices. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. E203-E211, 2011.

MADUREIRA, A. R.; SOARES, J. C.; AMORIM, M.; TAVARES, T.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. M.. MALCATA, F. X. Bioactivity of probiotic whey cheese: characterization of the content of peptides and organic acid. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 1458-1465, 2012.

OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.935-942, 2001.

PATEL, K. C.; CHEN, X. D. Sensivity analysis of the reaction engineering approach to modeling spray drying of whey proteins concentrate. **Drying Technology**, v. 26, p. 1334-1343, 2008.

- PESCUMA, M.; HÉBERT, E. M.; MOZZI, F.; VALDEZ, G. F. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 73-81, 2010.
- PESCUMA, M.; HÉBERT, E. M.; BRU, E.; VALDEZ, G. F.; MOZZI, F. Diversity in growth and protein degradation by dairy relevant lactic acid bacteria species in reconstituted whey. **Journal of Dairy Research**, v. 79, p. 201-208, 2012.
- PILVI, T. K.; HARALA, S.; KORPELA, R.; MERVAALA, E. M. Effects of high-calcium diets with different whey proteins on weight loss and weight regain in high-fat-fed C57BL/6J. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 337-341, 2009.
- PINTADO, M. E.; MALCATA, X. Effect of thermal treatment on the protein profile of whey from ovine and caprine milk throughout lactation. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 497-518, 1996.
- RAIKOS, V.; DASSIOS, T. Health-promoting properties of bioactives peptides derived from milk proteins in infant food: a review. **Dairy Science & Technology**, v. 94, p. 91-101, 2014.
- RAIZEL, R., SANTINI, E., KOPPER, A. M., FILHO, A. D. R. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência e Saúde**, v. 4, n. 2, p. 66-74, Porto Alegre, 2011.
- RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K.; Effect of dairy probiotic combinations on *in vitro* gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. **Journal of functional foods**, v. 8, p. 18-25, 2014.
- RAPETTI, L.; FALASCHI, U.; LODI, R.; VEZZOLI, F.; TAMBURINI, A.; GREPPI, G. F.; ENNE, G. The effect of liquid whey fed to dairy goats on milk yield and quality. **Small Ruminant Research**, v. 16, p. 215-220, 1995.
- REDDY, R. S.; RAMACHANDRA, C. T.; HIREGOUDAR, S.; NIDONI, U.; RAM, J.; KAMMAR, M. Influence of processing conditions on functional and reconstitution properties of milk powder made from Osmanabadi goat milk by spray drying. **Small Ruminant Research**, v.119, p.130-137, 2014.
- RICHTER, R.L.; VEDAMUTHU, E.R. Milk and milk products. In: COMPENDIUM OF THE METHODS FOR MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS. 4.ed. Washington, DC: **American Public Health Association**, 2001. p.483-495.
- RYAN, J. T.; ROSS, R. P.; BOLTON, D.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. **Nutrients**, v.3, p. 765-791, 2011.

SAH, B. N. I.; VASILJEVIC, T.; MCKECHNIE, S.; DONKOR, O. N. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. **Food Chemistry**, v. 156, p. 264-270, 2014.

SANMARTÍN, B.; DÍAZ, O.; RODRÍGUEZ-TURIENZO, L.; COBOS, A. Composition of caprine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese whey. **Small Ruminant Research**, v.105, p. 196-192, 2012.

SANTILLO, A.; KELLY, A. L.; PALERMO, C.; SEVI, A.; ALBENZIO, M. Role of indigenous enzymes in proteolysis of casein in caprine milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 655-660, 2009.

SODINI, I.; MATTAS, J.; TONG, P. S. Influence of pH and heat treatment of whey on the functional properties of whey protein concentrates in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1464-1469, 2006.

SOUZA, R. R.; BERGAMASCO, R.; COSTA, S. C.; FENG, X.; FARIA, S. H. B.; GIMENES, M. L. Recovery and purification of lactose from whey. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 49, p. 1137-1143, 2010.

TANG, J. E.; MOORE, D. R.; KUJBIDA, G. W.; TARNOPOLSKY, M. A.; PHILLIPS, S. M. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, p. 987-992, 2009.

TORRE, M.; COHEN, M. E.; CORZO, N.; RODRÍGUEZ, M. A.; DIEZ-MASA, J. C. Perfusion liquid chromatography of whey proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 729, p. 99-111, 1996.

TRANJAN, B. C.; CRUZ, A. G.; WALTER, E. H. M.; FARIA, J. A. F. ; BOLINI, H. M. A.; MOURA, M. R. L.; CARVALHO, L. M. J. Development of goat cheese whey-flavoured beverages. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, n. 3, p. 438-443, 2009.

VALDUGA, E.; PAVIANI, L. C.; MAZUR, S. P.; FINZER, J. R. D. Aplicação do soro de leite em pó na panificação. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 393-400, 2006.

VARGA, L.; SÜLE, J.; NAGYT, P. Survival of the characteristic microbiota in probiotic fermented camel, cow, goat, and sheep milks during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2039–2044, 2014.

WANG, W.; BAO, Y.; HENDRICKS, G. M.; GUO, M. Consistency, microstructure and probiotic survivability of goats' milk yoghurt using polymerized whey protein as a co-thickening agent. **International Dairy Journal**, v. 24, p. 113-119, 2012.

WATARU, A.; TAKANAMI, Y.; KAWAI, Y.; MORIFUJI, M.; KOGA, J.; KANEGAE, M.; MIHARA, K.; YANOHARA, T.; MUKAI, J.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Dietary whey hydrolysate with exercise alters the plasma protein profile: A comprehensive protein analysis. **Nutrition**, v. 27, p. 687-692, 2011.

XANTHOPOULOS, V.; C.G. IPSILANDIS, C. G.; TZANETAKIS, N. Use of a selected multi-strain potential probiotic culture for the manufacture of set-type yogurt from caprine milk. **Small Ruminant Research**, v. 106, n. 2-3, p. 145– 153, 2012.

ZANDEN, L. D. T. V. D.; KLEEF, E. V.; WIJK, R. A.; TRIJP, H. C. M. Knowledge, perceptions and preferences of elderly regarding protein-enriched functional food. **Appetite**, v. 80, p. 16-22, 2014.

ZEMEL, M.B. The role of dairy food in weight management. **Journal of the American College of Nutrition**, v.24, p. 537S–546S, 2005.