



Susana de Oliveira Matos da Cunha

Licenciada em Engenharia Química

Avaliação da estabilidade do soro de iogurte

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

Orientador: Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando,
Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes
Arguente(s): Prof. Doutor António Pedro Louro Martins
Vogal(ais): Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando

Avaliação da estabilidade do soro de iogurte

COPYRIGHT© em nome de Susana de Oliveira Matos da Cunha,
da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, e da
Universidade Nova de Lisboa.

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

Agradecimentos

Fui louvada por voltar a estudar para obter um grau de mestrado apesar de ter já anos de experiência na minha área, mas a verdade é que não foi um esforço porque não há nada que eu goste mais do que aprender. Por isso, começo por agradecer a todos os professores que cruzaram o meu caminho na Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNL pela sua dedicação e profissionalismo, bem como a todos os meus colegas do curso, pela sua amizade, simpatia e entreajuda. Eles fizeram o meu caminho interessante e agradável.

Devo agradecer em especial à orientadora deste trabalho, Prof. Ana Luísa Fernando, cujo envolvimento começou pela proposta deste tema tão interessante para a minha tese, e que foi além do seu dever para facilitar a logística das tarefas a realizar. Também a sua simpatia, boa disposição e dedicação foram cruciais para tornar o meu percurso uma fase amena da minha vida.

Também gostava de deixar uma palavra a todos os trabalhadores da Yonest, a começar pelo Eng. Filipe Botto por propor a parceria à FCT, mas também a Eng.^a Cristiana Nunes por toda a disponibilidade na resposta às minhas perguntas e no acompanhamento da recolha de amostras.

Não podia deixar de agradecer à minha família pelo apoio, compreensão e motivação, que acompanharam mais uma etapa da minha vida.

Finalmente, este trabalho não poderia ter sido feito sem a preciosa ajuda das técnicas do laboratório de química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNL. Às Sra. D. Rita Almeida Braga e Sra. D. Rosa Pinto, o meu profundo agradecimento pela sua participação e simpatia.

Resumo

O soro de leite é um subproduto das indústrias de queijo, caseína e iogurte concentrado, que necessita de tratamento dispendioso antes de ser descartado devido ao seu elevado teor de proteína e lactose. Soros de diferentes origens apresentam características de composição e propriedades funcionais distintas. Devido às menores quantidades produzidas a nível mundial, o soro proveniente de iogurtes concentrados não tem sido alvo de muitos estudos.

As proteínas do soro possuem propriedades nutricionais e funcionais muito apreciadas, e podem ser comercializadas na forma de concentrado ou em pó. O soro é também rico em lactose que pode ser recuperada. A transformação do soro nestes produtos é dispendiosa e o iogurte do tipo grego é muitas vezes produzido por pequenas explorações sem capacidade para transformar o soro. Surge então a necessidade de estabelecer um prazo de validade para este produto na forma bruta e estudar as melhores formas de armazenamento e estabilização.

Com este trabalho pretendeu-se estudar a estabilidade do soro de iogurte grego antes e depois de pasteurização. Para tal, foram caracterizados dois tipos de soro: soro de iogurte magro e soro de iogurte gordo. Ambos os soros apresentaram características gerais de soro do tipo ácido (soro derivado da coagulação da caseína por abaixamento de pH). O soro de leite magro apresentou mais proteína, lípidos, cinza e sólidos totais que o soro de leite gordo, que apresentou um maior teor de lactose. O soro de iogurte gordo apresentou também mais cálcio e fósforo do que o soro de iogurte magro, o que mostrou ter influência nas propriedades funcionais. Estas diferenças podem estar associadas à presença ou ausência de gordura no leite, no momento da coagulação do iogurte.

O soro de leite gordo foi analisado quanto à sua estabilidade. A pasteurização a 63 °C por 30 minutos (P63) mostrou-se eficaz no controlo microbiológico e as amostras mantiveram-se estáveis por 21 dias a 20 °C e por 90 dias a 4 e -18 °C. O tratamento térmico a 72 °C por 1 minuto em *batch* (P72) não se mostrou eficaz na redução da carga microbiológica, mostrando crescimento de bolores e leveduras (B&L) acima de 10^3 UFC mL⁻¹ logo a partir da segunda semana, mesmo estando conservada a 4 °C. O soro sem pasteurização (SP) foi avaliado em termos de estabilidade a 4 °C ao longo de 21 dias, tendo mostrado uma boa estabilidade química, mas um crescimento de B&L acima de 10^3 UFC mL⁻¹ a partir dos 13 dias. O tempo de vida útil do soro SP poderá ser estendido eliminando eventuais fontes de contaminação por B&L. Um maior equilíbrio entre as populações de *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* e de *Streptococcus thermophilus* poderá também ser benéfico à conservação do soro.

Nenhuma das condições estudadas apresentou aumento da proteólise com o tempo de armazenagem. Registou-se, no entanto, proteólise derivada da pasteurização através dum aumento do azoto amoniacal e diminuição do azoto solúvel com o aumento da temperatura de tratamento. Só se verificou uma diminuição do azoto proteico para a P72. O pH variou sem tendências entre 4,07 e 4,29 ao longo dos 90 dias do estudo. A acidez também não apresentou variações significativas situando-se entre 6,48 e 8,55 g de ácido láctico por litro. Estabelecer um pH máximo de 4,2 para o soro (e para o iogurte que o origina) poderá ser uma forma de controlo de qualidade e segurança alimentar neste produto.

A boa capacidade espumante demonstrada pelo soro em bruto abre possibilidades à sua utilização em bebidas como *smoothies* e batidos. Os resultados da capacidade emulsionante foram comparáveis aos de proteínas comercializadas como agentes emulsionantes. Existem produtos à base de soro de iogurte que podem ser desenvolvidos por um pequeno produtor, tais como iogurtes líquidos, bebidas de fruta proteínadas, e sobremesas lácteas. Outras possibilidades de valorização são discutidas.

A valorização de soro de leite deverá ser estudada caso a caso, isto é, para cada proveniência do soro, cada tratamento a que o soro é submetido, e cada destino considerado. É importante, pois, que pequenas e médias indústrias encontrem primeiramente um destino a dar ao seu subproduto, e só então adequem o tratamento a aplicar às características necessárias para o seu fim.

Palavras-chave: soro de leite, iogurte grego, pasteurização, prazo de validade, propriedades espumantes, propriedades emulsionantes

Abstract

Whey is a by-product of the cheese, casein and concentrated yogurt industries, which requires costly treatment before disposal due to its high protein and lactose content. Whey from different origins have different composition and functional properties. Whey from concentrated yogurt is produced in lower quantities worldwide, and has not been the subject of many studies.

Whey proteins have nutritional and functional properties much appreciated, and can be marketed as concentrate or powder. Whey is also rich in lactose which can be recovered. The transformation of whey in these products is expensive and Greek type yoghurt is often produced by small enterprises without the ability to transform the whey. A need to establish a shelf life for this product in raw form and study the best ways of storage and stabilization arises.

This work intended to study the stability of Greek yogurt whey before and after pasteurization. For this purpose, two types of whey were characterized: non-fat yogurt whey and whole yoghurt whey. Both types of whey had the general characteristics of acid type whey (whey derived from the coagulation of casein by lowering pH). The non-fat yogurt whey showed more protein, lipids, ash and total solids than whole yogurt whey, which showed higher lactose content. The whole yoghurt whey had also more calcium and phosphorus than the non-fat yoghurt whey. These differences in composition may be related to the presence or absence of fat in the curd, and that showed to have influence on the functional properties of whey.

Whole yogurt whey was analysed for its stability. Pasteurization at 63 °C for 30 minutes (P63) was effective in microbial control and the samples were stable for 21 days at 20 °C and for 90 days at 4 and -18 °C. Thermic treatment at 72 °C for 1 minute in batch (P72) was not effective in reducing microbial load, showing growth of moulds and yeasts (M&Y) above 10^3 CFU mL⁻¹ from as early as the second week, despite being stored at 4 °C. Non-pasteurized whey (NP) was assessed over 21 days at 4 °C having shown a good chemical stability, but also a growth of M&Y above 10^3 CFU mL⁻¹ after the 13th day. The shelf-life of NP whey may be extended eliminating all sources of contamination by M&Y. A better balance between the populations of *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* can also be beneficial to whey conservation.

None of the studied conditions showed increased proteolysis with storage period. There was, however, proteolysis derived from pasteurization detected by the increment in ammonia nitrogen, and the decreased in soluble nitrogen, with increasing treatment temperature. Only the P72 samples showed a decrease in proteic nitrogen. The pH varied without tendencies between 4.07 and 4.29 over the 90 day study period. Titratable acidity was between 6.48 and 8.55 g of lactic acid per litre, showing no significant variation. Establishing a maximum pH of 4,2 for whey (and for the yoghurt it comes from) may assure quality and food safety in this product.

The good foaming capacity demonstrated by raw whey opens up possibilities for its use in beverages like *smoothies*. Results of emulsifying capacity were comparable to those of proteins marketed as emulsifiers. There are whey based products that can be developed by a small producer, such as liquid yoghurt, protein fortified fruit drinks, and desserts. Other uses are discussed.

The recovery of whey must be studied case by case, i.e. for each whey source, each treatment applied to the whey, and each end use considered. It is important therefore that small and medium enterprises first find a destination of their by-product, and only then apply the treatment, tailored to the desired characteristics.

Keywords: whey, Greek yoghurt, pasteurization, shelf-life, foaming properties, emulsifying properties

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	V
Índice	VII
Índice de Figuras.....	IX
Índice de Tabelas.....	XI
Abreviaturas	XIII
Capítulo I. Introdução	1
1. Enquadramento do trabalho	1
2. O iogurte.....	2
2.1. Fabrico de iogurte grego	4
3. O soro como subproduto	6
3.1. Caracterização	8
3.2. Valor biológico e funcional do soro.....	10
3.3. Processamento do soro.....	13
4. Avaliação da estabilidade	15
4.1. Desenvolvimento microbiológico.....	17
4.2. Proteólise.....	18
5. Avaliação das propriedades funcionais	20
Capítulo II. Metodologia	23
1. A Yonest – True Yogurt	23
2. Projecto experimental.....	24
3. Produção do soro de iogurte.....	25
4. Amostragem e pasteurização.....	25
5. Caracterização do soro.....	27
5.1. pH, acidez e condutividade	27
5.2. Matéria seca e cinza	27
5.3. Lípidos.....	27
5.4. Açúcares	28
5.5. Proteína (azoto total)	28
5.6. Fósforo.....	29
5.7. Cloretos	30
5.8. Elementos minerais.....	30
6. Avaliação da estabilidade do soro pasteurizado.....	30

6.1.	pH, acidez e °Brix.....	30
6.2.	Análises microbiológicas	30
6.3.	Azoto amoniacal, solúvel e não proteico	31
7.	Avaliação das propriedades funcionais	32
7.1.	Estabilidade da espuma.....	32
7.2.	Capacidade Emulsionante	32
8.	Tratamento de dados	33
Capítulo III.	Resultados e Discussão.....	35
1.	Caracterização do soro	35
1.1.	Lípidos.....	36
1.2.	Açúcares	37
1.3.	Proteína e azoto	37
1.4.	Cinza e minerais.....	38
2.	Avaliação da estabilidade do soro pasteurizado	40
2.1.	pH, acidez e °Brix.....	40
2.2.	Análises microbiológicas	44
2.3.	Azoto amoniacal, solúvel e não proteico	48
3.	Avaliação das propriedades funcionais	53
3.1.	Propriedades Espumantes (PE)	54
3.2.	Capacidade Emulsionante (CE).....	57
Capítulo IV.	Valorização do soro de iogurte	61
Capítulo V.	Conclusões.....	69
Capítulo VI.	Referências	71

Índice de Figuras

Figura I.1 - Processo de produção do iogurte do tipo grego (gordo e magro).....	5
Figura I.2 - Produção portuguesa de soro concentrado e em pó.....	8
Figura I.3 - Esquema resumo dos principais tratamentos aplicados ao soro e seus produtos	14
Figura II.1 - Alguns produtos da Yonest.....	23
Figura II.2 – Pontos de venda da Yonest: Moto Yogurtman (esquerda) e Café Yogurtman (direita) ...	24
Figura II.3 - Equipamento onde foi realizada a pasteurização	26
Figura III.1 - Resultados de pH para as séries P63/20°C e SP/4°C	41
Figura III.2 - Resultados de pH para as séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C.....	41
Figura III.3 - Resultados da evolução da acidez para as séries SP/4°C e P63/20°C	42
Figura III.4 - Resultados da evolução da acidez para as séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C.....	42
Figura III.5 - Resultados da evolução do °Brix para as séries SP/4°C e P63/20°C.....	43
Figura III.6 - Resultados da evolução do °Brix para as séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C	43
Figura III.7 - Resultados das análises microbiológicas às amostras pasteurizadas a 63 °C	45
Figura III.8 - Resultados das análises microbiológicas às amostras P72	46
Figura III.9 - Resultados das análises microbiológicas às amostras sem pasteurização	47
Figura III.10 - Resultados do azoto amoniacal para as séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C	49
Figura III.11 - Resultados do azoto amoniacal para as séries SP/4°C e P63/20°C.....	49
Figura III.12 - Resultados do azoto solúvel para as séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C.....	50
Figura III.13 - Resultados do azoto solúvel para as séries P63/20°C e SP/4°C	51
Figura III.14 - Resultados do azoto não proteico para as séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C	52
Figura III.15 - Resultados do azoto não proteico para as séries P63/20°C e SP	52
Figura III.16 - Resultados de FE (%), ExE (%) e EE (%) para as várias amostras estudadas.....	55
Figura III.17 - Resultados e expressão das 1ª e 2ª derivadas para a amostra SP gordo	58
Figura III.18 - Resultados da capacidade emulsionante para as várias amostras estudadas.....	59

Índice de Tabelas

Tabela I.1 - Composição genérica do soro de leite	8
Tabela I.2 - Teor de algumas vitaminas no soro bruto.....	10
Tabela I.3 - Definições de período de vida útil dum alimento	15
Tabela II.1 - Dias de armazenagem das várias amostras.....	26
Tabela III.1 - Resultados de condutividade e pH dos diferentes tipos de amostra.....	35
Tabela III.2 - Caracterização do soro de iogurte (P63)	36
Tabela III.3 - Resultados das fracções de azoto amoniacal, solúvel e não proteico para cada tratamento	38
Tabela III.4 - Resultados da análise da cinza do soro	39
Tabela III.5 - pH e condutividade das amostras utilizadas para a análise das propriedades funcionais	54
Tabela III.6 - Capacidade de formação de espuma de algumas proteínas.....	57
Tabela IV.1 - Aplicações de soro de leite.....	62

Abreviaturas

ANP – Azoto não proteico

B&L – Bolores e Leveduras

BOD₅ – Carência bioquímica de oxigénio calculada para 5 dias (*biochemical oxygen demand*)

BSA – Albumina do soro bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CE – Capacidade emulsionante

CFU – *Colony forming units*

COD₅ – Carência química de oxigénio calculada para 5 dias (*chemical oxygen demand*)

EE - Estabilidade da espuma

ETAR – Estação de tratamento de águas residuais

ExE – Capacidade de expansão da espuma

FE – Capacidade de formação de espumas

HACCP – Análise de riscos e pontos críticos de controlo (*Hazard analysis and critical control points*)

IAE – Índice de actividade emulsionante

Ig – Imunoglobinas

LAB – Bactérias Ácido-Lácteas (*Lactic Acid Bacteria*)

M&Y – *Moulds and yeasts*

MRS – *Man Rogosa Sharpe Agar* (meio de cultura microbiológica)

MTV – Microrganismos Totais Viáveis

NP – *Non-pasteurized whey*

P63 – Pasteurização a 63 °C por 30 minutos em *batch*

P72 – Pasteurização a 72 °C por 1 minuto em *batch*

PCA – *Plate Count Agar* (meio de cultura microbiológica)

PE – Propriedades espumantes

RBC – *Rose Bengal Chloramphenicol Agar* (meio de cultura microbiológica)

SP – Sem pasteurização

T0 a T90 – Tempo de armazenagem de X dias (X = 0, 3, 7, 9, 13, 14, 17, 21, 27, 42, 56, 62, 90)

TCA – Ácido tricloroacético

UFC – Unidades formadoras de colónias

α -La – α -Lactalbumina

β -Lg – β -Lactoglobina

Capítulo I. Introdução

1. Enquadramento do trabalho

O soro é um subproduto das indústrias de queijo, caseína e iogurte concentrado, que necessita de tratamento dispendioso antes de ser descartado. O seu elevado conteúdo proteico e de açúcares resultam numa elevada carência bioquímica de oxigénio (BOD_5), na ordem de 35000 – 55000 mg $O_2 L^{-1}$ e uma carência química de oxigénio (COD_5) de cerca do dobro (Tsakali, *et al.*, 2010). As indústrias que possuem este subproduto têm procurado a sua valorização, integrando-o em outros produtos ou criando novos produtos derivados do soro, havendo já várias soluções de valorização bem-sucedidas.

As soluções de valorização passam geralmente por um processo de *spray-drying* (semelhante ao usado na fabricação de leite em pó), produzindo um pó com elevado teor proteico que pode ser incorporado em farinhas para panificação, lacticínios, sobremesas, bebidas proteicas para atletas, ou usado na preparação de emulsões e espumas (Siso, 1996). Outra forma comum de utilização do soro é na forma concentrada, que é geralmente produzida por processos de ultrafiltração, podendo incluir uma etapa de desmineralização ou separação das proteínas de forma a valorizar a jusante cada componente do soro separadamente (Bylund, 1995). Estes processos, no entanto, comportam elevados custos energéticos e de investimento, só indicados para explorações de grandes dimensões, excluindo pequenos e médios produtores de queijo e de iogurte concentrado. Para estes, as soluções mais viáveis passam pela valorização do soro como produto líquido em bruto. Este produto é muitas vezes encaminhado para explorações agro-pecuárias onde pode ser usado como bebida para animais ou fertilizante agrícola, mas sempre que possível é também incorporado em produtos para a alimentação humana, tais como bebidas e produtos à base de fruta e vegetais (Holsinger, *et al.*, 1974; Shon & Haque, 2007).

O soro de queijo encontra-se extensamente caracterizado na literatura, inclusive derivado da produção de diferentes tipos de queijo, encontrando-se também diversos estudos sobre a sua possível utilização em produtos alimentares ou na produção de ácido láctico, lactose ou como meio de cultura para microrganismos (Panesar, *et al.*, 2007; Siso, 1996; Soydemir, 2008). No entanto, é escassa a literatura referente a soro de iogurte, naturalmente devido às menores quantidades produzidas a nível mundial.

A produção da maioria dos tipos de iogurte não produz soro como subproduto. Somente no caso dos chamados iogurtes concentrados é que o soro é separado (Bylund, 1995). Neste caso, como por exemplo para um iogurte do tipo grego, as quantidades de soro são aproximadamente iguais à quantidade de iogurte preparado, e o seu destino final tem de ser planeado. Dado que o iogurte do tipo grego é muitas vezes produzido por pequenas explorações sem capacidade para transformar o soro em pó, surge a necessidade de estabelecer um prazo de validade para este produto na forma bruta e estudar as melhores formas de armazenamento e estabilização.

Com este trabalho pretendeu-se estudar a estabilidade do soro de iogurte grego antes e depois de pasteurização. Para tal, efectuou-se uma caracterização do soro quanto à sua

composição, pH e acidez, ao que se seguiu o estudo do crescimento microbiológico e da proteólise ao longo do tempo, para várias temperaturas de armazenamento. Foram também efectuados testes à capacidade emulsionante e espumante do soro bruto e discutidas possíveis formas de valorização.

2. O iogurte

A fermentação do leite é uma prática ancestral que surgiu quase simultaneamente com a domesticação de ruminantes, há cerca de 10 000 anos. Existem vários tipos de leites fermentados com origem em diferentes zonas do globo, onde a conjugação de hábitos, clima e microrganismos concorreram para a descoberta da extensão do tempo de vida útil do leite através da fermentação por bactérias lácteas. (Tamime, 2006)

O leite de diferentes animais foi usado dando origem a produtos característicos. Enquanto na Europa é preferido o leite de vaca, o leite de búfala é muito usados em vários países asiáticos, enquanto o leite de ovinos, caprinos e camelo são os materiais de partida para leites fermentados em vários países do Médio Oriente. A microflora também é muito variada. Nas zonas mais quentes, bactérias termófilas (35-45 °C) estão presentes na maioria dos produtos (por exemplo em iogurte, *labneh* e no iogurte concentrado dito “tipo grego”), e nas zonas mais frias foram utilizadas bactérias mesófilas (20-30 °C), como por exemplo os *buttermilk*, *filmjolk*, *täetmjolk* e *långofil* originários do norte da Europa. Em alguns locais utilizaram-se adicionalmente leveduras para criar produtos lácteos com algum teor alcoólico como o *kefir* e o *kumys*, originários da Rússia e Ásia Central. Também existem produtos com adição de bolores, como o uso de *Geotrichum candidum* na produção de *viili*, na Finlândia. (Chandan & Kilara, 2013; Tamime, 2002)

Estes produtos variam ainda por adição de diferentes componentes como açúcares, fruta, condimentos, grãos e frutos secos, e ainda pelos métodos utilizados como concentração, congelamento e secagem, que em conjunto com o resultado da actividade microbiana resultam numa vasta variedade de *flavours* e texturas. A maioria destes produtos tem institucionalizadas propriedades características em termos de acidez, pH, teor alcoólico (*kefir*, *kumys*), composição (em especial o teor de gordura) e/ou microflora específica (células viáveis dos microrganismos fermentativos e, quando aplicável, probióticos). Outras características controladas ao longo da produção são: pH, viscosidade, *flavour* e aparência visual (cor, enchimento do recipiente, formação de grumos, corpo e textura e integridade geral). (Chandan & Kilara, 2013)

Os iogurtes podem ser categorizados pela sua consistência e composição. Em termos de consistência os iogurtes podem ser sólidos, batidos, líquidos, gelados ou concentrados. Os iogurtes sólidos são aqueles que apresentam uma textura firme, sofrendo uma coagulação directamente nas embalagens individuais de venda a retalho, não sendo aplicada qualquer tipo de homogeneização. Por seu lado, os iogurtes batidos têm uma textura cremosa, passando o seu processo de fabrico por uma prévia coagulação em cubas de fermentação sendo posteriormente embalado. Quanto aos iogurtes líquidos, tal como o nome indica, têm uma estrutura menos viscosa que é conseguida através da liquefacção do coágulo antes de ser embalado. Os iogurtes

gelados (ou gelado de iogurte) são congelados do mesmo modo que um gelado, após a sua incubação em tanques. Finalmente, os iogurtes concentrados, em que se inclui o iogurte do tipo grego, são dessorados após incubação, perdendo 50-65% do seu volume na forma de soro. (Bylund, 1995)

A classificação quanto à composição pode ser relativa ao conteúdo de matéria gorda ou à adição de açúcares ou fruta. Relativamente à matéria gorda, a divisão dos iogurtes é feita em gordo, meio-gordo e magro, conforme o teor de gordura presente na parte láctea de cada uma delas. Para os iogurtes gordos este teor de gordura é no mínimo de 3,5% (m/m), para os meios-gordos situa-se entre 1,5% (m/m) e 1,8% (m/m), e os magros terão um máximo de 0,3% (m/m). (Portaria nº 742/92, 1992)

Quanto aos aditivos, o iogurte pode ser natural, açucarado, aromatizado ou com pedaços de fruta. Um iogurte natural é constituído apenas pelo leite e culturas microbianas, não sofrendo qualquer tipo de adição. Em contraposição, um iogurte açucarado é um iogurte ao qual se adicionou sacarose ou outro tipo de açúcar, edulcorantes e emulsionantes. Os iogurtes aromatizados têm adição de aromas ou outros aditivos alimentares. Finalmente, os iogurtes com pedaços são aqueles aos quais se adicionam pedaços de fruta, geralmente na forma dum xarope com 50% de açúcar, constituindo cerca de 15% do produto final. (Bylund, 1995; Portaria nº 742/92, 1992)

A portaria nº 742/92, de 24 de Julho, define o iogurte como um produto coagulado obtido por fermentação láctica devido à acção exclusiva de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) e *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) sobre o leite ou produtos lácteos (leite pasteurizado, leite pasteurizado parcialmente desnatado, leite pasteurizado desnatado ou nata pasteurizada), com ou sem a adição de leite em pó ou derivados, açúcares ou edulcorantes, devendo a flora específica estar viva e abundante no produto final (mínimo de 10^7 UFC¹ g⁻¹).

O processo geral de fabrico do iogurte é relativamente simples, consistindo num pré-tratamento térmico do leite (já homogeneizado quanto ao teor de gordura) que reduz a carga microbiana e desnatura parcialmente as proteínas do soro, seguido da inoculação com as bactérias ácido lácteas (LAB) e incubação à temperatura adequada ao seu crescimento. Com o abaixamento do pH pela formação de ácido lácteo, dá-se a coagulação da caseína que forma uma estrutura reticular com os lípidos, os minerais e algumas das proteínas do soro desnaturadas, formando um gel com uma consistência firme ou viscosa (iogurtes sólidos ou batidos). Nos iogurtes líquidos é efectuada uma homogeneização posterior para converter o coágulo a partículas, com adição de estabilizantes. Nesta fase são então adicionados os aditivos adequados (açúcar, sumo ou pedaços de frutas, aromas) e o produto é então embalado. Finalmente, nos iogurtes concentrados é efectuado um dessoramento, com perda de água e nutrientes na forma de soro. (Tamime, 2006) O processo de fabrico do iogurte concentrado é discutido na secção 2.1.

Hoje em dia, o produto de leite fermentado mais popular é o iogurte e o seu consumo tem vindo a aumentar. A nível mundial, segundo os dados da Food and Agriculture Organization (FAO), verificou-se um aumento no fabrico na última década (cerca de 250 mil toneladas em

¹ UFC – Unidades Formadoras de Colónias

2003 para cerca de 280 mil toneladas em 2013). O nível de produção não tem tido uma subida constante, tendo havido um pico de produção nos anos 2006 e 2007. (FAO, 2015)

Em Portugal, segundo os dados do Instituto Nacional de Estatística, o consumo *per capita* de leite fermentado aumentou de 18,5 para 22,4 kg por habitante e por ano, no período compreendido entre 2003 e 2013. Em 2012 consumiram-se 233 mil toneladas de leite fermentado em Portugal. Apesar disso, das 344 empresas de lacticínios em funcionamento nesse ano, cerca de 76% eram pequenas empresas empregando menos de 10 pessoas (INE, 2015).

O aumento do consumo de iogurte pode-se atribuir à consciencialização da população para uma alimentação mais saudável, na qual os iogurtes têm sido incluídos. Além de poder ser considerado um substituto do leite, tem diversas outras características nutricionais que o tornam um alimento relevante. O leite é um alimento completo com proteínas de elevado valor biológico, um açúcar de fácil digestibilidade (a lactose) e vários minerais e vitaminas essenciais. No entanto, uma percentagem da população não consegue digerir facilmente a lactose por não possuir o enzima β -galactosidase (lactase) no seu sistema digestivo, mas a flora específica do iogurte pré-digere a lactose, por processos que ainda não são completamente conhecidos, tornando este produto adequado para quem possui este tipo de intolerância. O iogurte concentrado é ainda mais adequado para este fim, dado que a quase totalidade da lactose é removida no dessoramento. (Chandan & Kilara, 2013)

2.1. Fabrico de iogurte grego

O iogurte do tipo grego é um iogurte concentrado. O seu processo geral de fabrico é apresentado na Figura I.1.

O iogurte concentrado feito pelo método tradicional começa por um pré-tratamento térmico que não é tão intenso como o dos iogurtes não dessorados. Nestes últimos, o pré-tratamento usualmente aplicado é de 90-95 °C por 5-10 minutos. Isto permite desnaturar 70 a 80% das proteínas do soro, facilitando a sua interacção na estrutura reticular do coágulo, e assim minimizar o fenómeno de sinérese (separação do soro após produção e embalagem), e melhorar a consistência (iogurtes sólidos) ou viscosidade (iogurtes batidos) do produto final. No caso do iogurte concentrado, pretende-se a separação do soro após incubação, pelo que as temperaturas aplicadas no pré-tratamento são somente as suficientes para alterar a estrutura da caseína de forma a facilitar a criação da estrutura do coágulo. Outras funções do pré-tratamento térmico são: a desnaturação parcial de algumas proteínas de forma a libertar aminoácidos que irão estimular a acção das culturas *starter*; a expulsão de oxigénio do leite para criar condições propícias ao crescimento das bactérias microaerófilas do *starter*; e a redução da flora endógena do leite que poderia de outro modo competir com as LAB. (Bylund, 1995; Tamime, 2006)

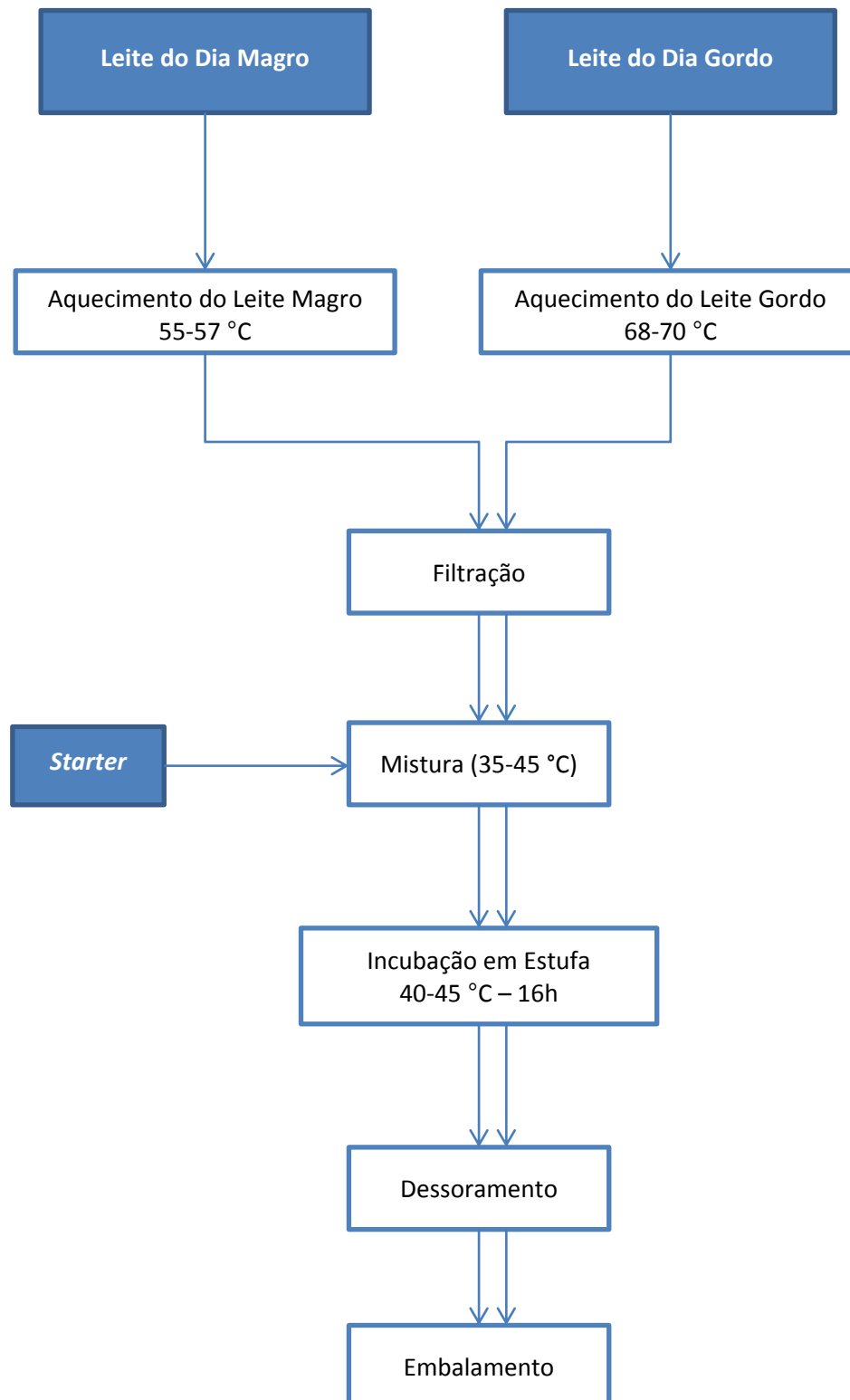


Figura I.1 - Processo de produção do iogurte do tipo grego (gordo e magro)

Após o pré-tratamento, o produto é filtrado para remover impurezas e arrefecido até 35-45 °C, a temperatura óptima para o crescimento das bactérias do *starter*. O *starter* é então adicionado e bem misturado, e o produto é incubado a 40-45 °C por cerca de 16 horas, até ao pH desejado, dependendo do *flavour* que se pretende obter. A coagulação da caseína inicia-se a pH 5,2-5,3 e considera-se completa a pH 4,6. O pH deverá obrigatoriamente ser inferior a este valor, mas um pH muito baixo pode resultar num produto demasiadamente ácido. O pH ideal depende dos teores de gordura e de sólidos totais. Ao passo que um pH de 4,2 é aceitável num iogurte não concentrado, o pH dum iogurte do tipo grego pode descer até 3,7-3,8 sem que se torne demasiado ácido, dada a sua maior concentração de sólidos totais. (Chandan & Kilara, 2013; Tamime, 2006)

Durante a incubação, o *L. bulgaricus* degrada a caseína, fornecendo peptídeos e aminoácidos aos *streptococci*, que têm fraca capacidade proteolítica. O *S. thermophilus* cresce mais rapidamente de início, baixando o potencial redox e acidificando ligeiramente o meio. Estas condições são satisfatórias para o crescimento do *L. bulgaricus* que aumenta a acidificação do meio. As duas espécies crescem em simbiose e vão fermentando a lactose a ácido láctico, libertando para o meio os compostos responsáveis pelo aroma característico do iogurte, nomeadamente diacetil (*S. thermophilus*) e acetaldeído (*L. bulgaricus*), mas também ácidos gordos voláteis, etanol, acetoina, ácido acético e butanona. O ácido láctico, cerca de 90% dos produtos da fermentação, além de acidificar o meio actua como conservante no produto final. (Chandan & Kilara, 2013; Nogueira, *et al.*, 1998)

A pH abaixo de 4,6 a maioria da caseína precipita na forma de sais de caseína (p. ex. caseinato de sódio) e forma-se o coágulo formado por caseína ligada a algumas proteínas do soro, formando uma estrutura reticular que retém os lípidos, a água e minerais dissolvidos ou precipitados. (Bylund, 1995; Chandan & Kilara, 2013)

O dessoramento pelo método tradicional é efectuado colocando o iogurte em sacos de pano e deixando o soro escoar por acção da gravidade. Hoje em dia usam-se filtros de fibra sintética, mais higiénicos, ou, a nível duma indústria de maior dimensão, efectua-se o dessoramento em centrífugas ou por aplicação de pressão. O dessoramento por acção da gravidade dura entre 15 a 20 horas e deve ser efectuado a uma temperatura abaixo dos 10 °C, até a uma concentração de sólidos totais de cerca do dobro da inicial. A concentração de sólidos inicial e a temperatura de dessoramento são factores determinantes do rendimento do processo. (Tamime, 2006)

Após dessoramento, o iogurte concentrado está pronto a ser embalado. O subproduto, o soro de leite escoado, é o objecto deste trabalho.

3. O soro como subproduto

Por cada kg de queijo são produzidos aproximadamente 8,7 kg de soro (Morr, 1992). Já no caso do iogurte concentrado, o valor pode variar entre 1 a 1,5 kg de soro por cada kg de iogurte (Nergiz & Seçkin, 1998). Na produção de caseína, a quantidade de soro produzido varia com o método utilizado, sendo o mais implementado a acidificação química, resultando num soro ácido (Bylund, 1995). Mundialmente são produzidos cerca de 145 milhões de toneladas de soro, maioritariamente da produção de queijo e caseína, mas também da produção de iogurte concentrado (Tsakali, *et al.*, 2010).

O soro é um efluente extremamente poluente, tendo um BOD₅ de 35000 mg L⁻¹ e um COD₅ de 68000 mg L⁻¹. Isto é devido ao elevado teor de proteína (cerca de 0,55% em base húmida) que fornece azoto e fósforo, mas também ao elevado teor de lactose (cerca de 4,8% em base húmida) que fornece substrato à actividade microbiana. O tratamento deste efluente é complicado, devendo combinar vários métodos de forma a conseguir uma redução da carga orgânica dentro dos valores legais. Além disso, o soro é especialmente difícil de tratar por métodos convencionais de tratamento de efluentes, visto que as propriedades emulsionantes das proteínas impedem a sedimentação das lamas na ETAR. A produção de etanol, biomassa ou metano para produção de energia é por vezes utilizada e pode reduzir o BOD₅ até 75%, mas não evita a necessidade de tratamento aeróbio. (Bylund, 1995; Mawson, 1994; Morr, 1992)

No entanto, a classificação do soro de leite como efluente é um desperdício de componentes com elevado valor comercial e nutricional. O soro contém cerca de 20% das proteínas do leite, proteínas estas com elevado potencial de actividade biológica, e a quase totalidade da lactose do leite, que constitui cerca de 75% dos sólidos do soro. Por estas razões, o aproveitamento do soro de uma ou outra forma não é algo recente, apesar de, no início dos anos 90, ainda somente 50% da produção mundial de soro era tratada como subproduto de valor económico em vez de efluente a alijar. (Bylund, 1995; Smithers, 2008)

Historicamente, o reaproveitamento do soro começou pela utilização como bebida para animais ou fertilizante líquido. Um trabalho por Ryder (1980) apresenta estas soluções como as principais utilizações economicamente vantajosas no início dos anos 80. Na alimentação animal, foi calculado que 1 L de soro em bruto fornece a mesma proteína e energia que 0,081 kg de cevada, estando o seu uso limitado pelo conteúdo mineral, que poderá ser excessivo. Na agricultura o soro pode ser utilizado na irrigação em 110-220 toneladas por hectare, fornecendo água, azoto e fósforo, mas apenas em solos neutros ou básicos. (Morr, 1992; Ryder, 1980)

Uma grande percentagem do soro produzido mundialmente é ainda valorizado dessa forma, mas avanços nos anos 80 e 90 nas tecnologias de processamento e no conhecimento da tecnologia alimentar, permitem agora valorizar o soro pelo valor dos seus componentes (Smithers, 2008). Siso (1996) reporta que o uso do soro, à data do seu estudo, era de cerca de 45% na forma bruta, 30% em pó, 15% como lactose ou derivados da lactose e 10% como concentrados de proteína do soro. Em 2013, foram produzidos 97 milhões de toneladas de queijo mundialmente e 134 milhões de toneladas de concentrados e pós de soro. Em Portugal, só nos últimos anos é que a produção de concentrados e pós de soro começou a ganhar expressão, como se pode ver pelo gráfico da Figura 1.2, e as quantidades produzidas não acompanham a produção nacional de queijo, que rondou as 70 mil toneladas por ano em 2013. (FAO, 2015)

A valorização do soro pelos seus componentes, que tem ganho maior expressão na última década, só foi possível devido aos avanços no conhecimento das funcionalidades e interações das proteínas do soro com os vários componentes dum sistema alimentar. As proteínas do soro são o componente de mais alto valor do soro, principalmente pelo maior destaque que os produtos com actividade nutracêutica têm vindo a ganhar nos últimos anos.

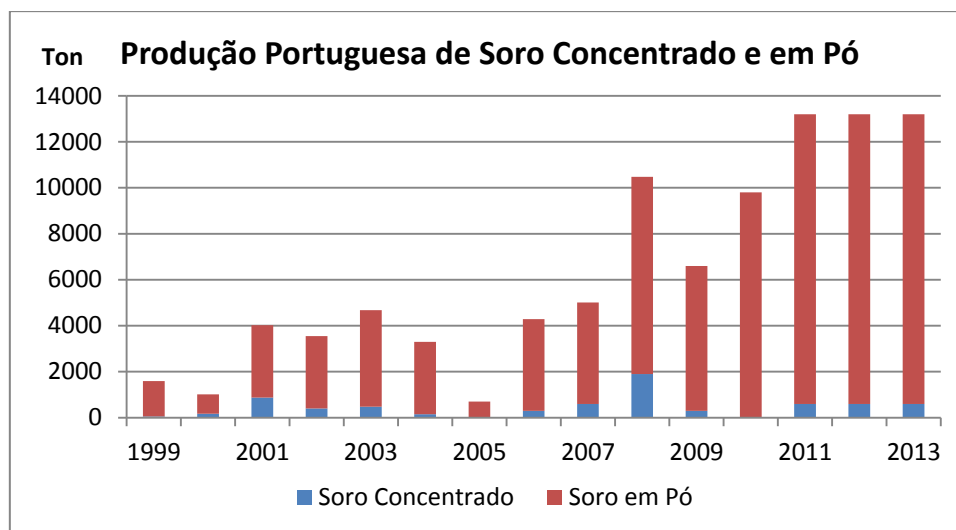


Figura I.2 - Produção portuguesa de soro concentrado e em pó

Fonte: FAO (2015)

3.1. Caracterização

O soro do leite é um líquido amarelo resultante da coagulação e remoção da caseína e comporta 80 a 90% do volume total do leite, contendo cerca de 50% dos seus nutrientes originais. O principal componente do soro é a lactose, cerca de 75% dos sólidos totais, seguido das proteínas do soro. A composição genérica do soro é apresentada na Tabela I.1.

Tabela I.1 - Composição genérica do soro de leite

Constituinte (%) ¹	Soro de Queijo	Soro Ácido (Produção de Caseína)
Sólidos Totais	6,8%	7,0%
Lípidos	0,8%	0,6%
Proteína	11,4%	11,4%
Lactose	75,0%	76,6%
Cinza	7,8%	12,5%
Cálcio	0,7%	1,8%
Fósforo	0,6%	1,0%
Sódio	0,8%	0,8%
Potássio	2,5%	2,5%
Cloretos	1,7%	1,7%

Adaptado de Bylund (1995).

¹ Percentagens dos sólidos totais.

O soro pode ser classificado como soro “doce” ou soro “ácido”. A coagulação da caseína pode ser efectuada por coagulação enzimática, e nesse caso é produzido um soro de pH entre 5,9 a 6,6, referido na literatura como “soro doce”, “soro rennet” ou simplesmente “soro de queijo”. O soro ácido, com pH entre 4,3 e 4,6, é produzido por acidificação do leite até ao ponto

isoeléctrico da caseína, por adição de LAB, no caso de queijos frescos ou iogurte, ou por acidificação química, no caso da produção de caseína. (Bylund, 1995; Zall, 1992)

Quase 80% das proteínas do leite são caseínas que formam o coágulo que constitui o iogurte, juntamente com as proteínas da membrana. Estas proteínas da membrana são um grupo de proteínas existente no leite, que forma uma camada protectora em volta dos glóbulos de gordura, estabilizando a emulsão, e que só podem ser separadas destes por acção mecânica. O baixo conteúdo de gordura do soro é consequente das ligações reticulares que se formam entre a caseína e as proteínas existentes na membrana dos glóbulos de lípidos existentes no leite. (Bylund, 1995)

As restantes proteínas são chamadas proteínas do soro e incluem principalmente β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactoalbumina (α -La), albumina do soro bovino (BSA) e imunoglobinas (Ig), entre outras. Tal como uma percentagem das proteínas do soro permanece no iogurte, alguma caseína ou fragmentos desta permanece também no soro. Podem ainda existir algumas proteínas desnaturadas (peptídeos e aminoácidos livres) devido às temperaturas utilizadas no tratamento do leite que antecede o fabrico do iogurte. (Bylund, 1995; De Wit & Klarenbeek, 1984)

O soro de queijo possui uma maior percentagem de fragmentos de caseína do que o soro ácido (20% no soro de queijo e apenas 2% no soro ácido), mas a restante composição relativa das proteínas é muito semelhante. A β -Lg compõe mais de 50% das proteínas do soro ácido, seguida da α -La (23%) e das Ig e BSA (6% cada). Entre as fracções menores das proteínas do soro encontram-se proteínas com actividade biológica como a lactoferrina e o enzima lactoperoxidase (ver também secção seguinte). Existem ainda uma quantidade considerável de complexos proteína-fosfolípidos presente (cerca de 5%). (Patel, *et al.*, 2015; De Wit, 1998)

A β -Lg existe em forma de dímero a pH entre 5,5 e 7,5, mas dissocia-se em monómeros para outros pH e acima de 40 °C. Cada monómero possui 2 resíduos de cistina e 1 de cisteína, o que significa que forma duas pontes de enxofre na sua estrutura tridimensional e possui um grupo tiol livre para formar pontes de enxofre com outras proteínas. A α -La é uma proteína globular compacta com um peso molecular relativamente baixo. É bastante resistente à desnaturação pelo calor, alterando a sua conformação de forma reversível. Possui grupos carboxílicos que se ligam fortemente ao cálcio a pH superiores a 4. A presença ou ausência de cálcio tem grande influência na sua conformação. Possui 4 pontes de enxofre intramoleculares responsáveis pela reversibilidade da sua desnaturação. A BSA é conhecida por efectuar o transporte de ácidos gordos na corrente sanguínea. É uma proteína de cadeia longa com 35 resíduos de cisteína, e que sofre desnaturação ácida a pH inferior a 4,0. As Ig presentes no soro de leite bovino são constituídas principalmente por Imunoglobina G (cerca de 80%), mas incluem também as imunoglobinas A, M e E. Estas Ig são as mesmas que existem no leite humano e que conferem imunidade passiva ao recipiente. Cada classe de Ig tem as suas características e comportamento quanto a variações de pH e temperatura. (De Wit & Klarenbeek, 1984; Mulvihill & Donovan, 1987)

O teor de cinza do soro é muitas vezes o factor limitativo para a sua utilização ou tratamento. No caso do soro de queijo, possui muitas vezes um alto teor de sódio e cloretos

derivado do fabrico do queijo, que limita a sua utilização para irrigação de solos ou incorporação em produtos para a alimentação animal ou humana. O soro ácido possui, no entanto, um teor ainda maior de cinza, com um conteúdo de cálcio elevado (dado que os sais de cálcio são mais solúveis nesse pH, e pelo fato de se libertar do complexo caseínico), o que interfere na eficiência dos tratamentos a aplicar ao soro. (Zall, 1992)

O soro possui ainda um conteúdo vitamínico considerável, em especial as do complexo B, mas também todas as restantes vitaminas hidrossolúveis. A Tabela I.2 apresenta os valores comuns de algumas vitaminas no soro.

Tabela I.2 - Teor de algumas vitaminas no soro bruto

Vitamina	Teor no soro bruto (mg kg ⁻¹)
Tiamina	0,31
Riboflavina	0,16
Niacina	1,18
Ácido Pantoténico	3,94
Ácido Fólico	0,07
Colina	108,00

Adaptado de Zall (1992)

Existem outros componentes do leite que podem estar presentes no soro conforme os tratamentos que foram previamente aplicados. Um desses são os enzimas, dado que a temperatura de inactivação varia de um enzima para outro - um facto que tem sido amplamente utilizado para determinar o grau de pasteurização de leite. Por regra, a temperatura óptima dos enzimas varia entre 25 e 50 °C e a sua temperatura de inactivação situa-se entre 50 e 120 °C. Conforme os tratamentos aplicados, o soro pode conter Peroxidase (inactiva se tratada a 80 °C por alguns segundos), Catalase (destruída a 75°C por 60 segundos), Phosphatase (72°C por 15 a 20 segundos), ou Lipase (maioritariamente inactivada por pasteurização, mas pode aparecer posteriormente por síntese microbiana). (Bylund, 1995)

Finalmente, também dependendo dos tratamentos aplicados ao leite, poderão existir diversos microrganismos no soro originários do leite, para além das LAB inseridas no fabrico do iogurte. (Bylund, 1995)

3.2. Valor biológico e funcional do soro

O leite de vaca evoluiu para fornecer nutrição e protecção imunológica aos vitelos em crescimento e, como tal, contém muitos componentes com actividade biológica reconhecida, a maioria destes presentes no soro. A proteína do soro tem um valor biológico excepcional que ultrapassa o da proteína do ovo, a antiga proteína de referência, por cerca de 15%. A FAO define valor biológico como a proporção de azoto absorvido que é retido no organismo e presumivelmente utilizado para a síntese de proteínas, reflectindo portanto verdadeira qualidade duma proteína (Srikantia, 1981). Em essência, refere-se a quanto e quão rapidamente o corpo pode utilizar a proteína consumida, e as proteínas do soro de leite (a α -La em particular)

destacam-se neste campo e são a proteína de escolha para culturistas, atletas de alta competição, e pessoas com problemas de saúde. (De Wit, 1998; Steele, 2004)

As proteínas do soro de leite são uma boa fonte de aminoácidos essenciais, quando comparadas com outras proteínas alimentares típicas, e também são ricas em aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina, valina) e de enxofre (metionina, cisteína) que desempenham um papel regulador no metabolismo humano. (Steele, 2004)

A β -Lg é bastante resistente aos ácidos e enzimas proteolíticas existentes no estômago, e pensa-se ser um importante transportador de retinol (provitamina A) para os vitelos, mas este factor não tem muita importância na alimentação humana (razão pela qual esta proteína não está presente no leite materno). É a proteína do soro que apresenta maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada e é uma boa fonte de cisteína, um precursor da glutathione intracelular com acção anticarcinogénica contra tumores intestinais. A α -La é a segunda proteína do soro e a primeira do leite humano, caracterizando-se por ser de muito fácil digestão. Contém o maior teor de triptofano entre todas as fontes proteicas alimentares (6%), sendo também rica em lisina, leucina, treonina e cistina. A α -La possui ainda a capacidade de se ligar a certos minerais e afectar positivamente sua absorção. Além disso, a α -La apresenta actividade antimicrobiana contra bactérias patogénicas, como, por exemplo, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. (De Wit, 1998; Haraguchi, *et al.*, 2006)

A BSA liga-se ácidos gordos livres insolúveis facilitando o seu transporte no sangue e também é provavelmente uma fonte importante para a produção de glutathione, dado o seu elevado conteúdo de cisteína (cerca de 6%). A principal imoglobina do soro, a imoglobina G, está presente em todos os mamíferos, e, em conjunto com as restantes Ig do soro, confere imunidade passiva e tem actividade antioxidante. (Haraguchi, *et al.*, 2006)

Mas existem ainda outras proteínas bioactivas no soro, como a lactoferrina, a lactoperoxidase, e peptídeos bioactivos, entre outros, cada um dos quais presente no soro em pequenas, mas significativas, quantidades.

A lactoferrina, existente no soro em cerca de 35 mg L^{-1} (Bylund, 1995), é considerada como tendo propriedades antibacterianas, anticarcinogénicas, antioxidantes e moduladoras do sistema imunitário. Por ser uma proteína que se liga ao ferro, considera-se que facilita a sua absorção tendo um papel transportador no sistema gastrointestinal, e é possível que tenha um papel sequestrante de toxinas. (Chandan & Kilara, 2013) Tem também sido demonstrado que possui propriedades de melhoramento do crescimento ósseo. Esta pesquisa tem ajudado a formar uma forte base científica para o uso de lactoferrina como um complemento a várias estratégias na prevenção e tratamento da osteoporose. (Smithers, 2008)

O teor típico de lactoperoxidase no soro ronda os 20 mg L^{-1} (Bylund, 1995). A lactoperoxidase é conhecida por ter actividade antimicrobiana, que tem sido explorada numa variedade de produtos de saúde oral, nomeadamente na inibição de microorganismos associados à gengivite e para promover a cicatrização de sangramento nas gengivas (Smithers, 2008). Dada a sua acção sobre o peróxido de hidrogénio, é considerada um preservativo natural, e tem sido sugerido o seu uso para controlar a acidificação do iogurte após embalagem (Chandan & Kilara, 2013).

Existem também uma série de peptídeos bioativos, nomeadamente a lactoferrina (derivada da lactoferrina), as seroforina e albutensina (derivadas da BSA), as β -lactotensina e β -lactoforina (derivadas da β -Lg) e a α -lactoforina (derivada da α -La). A sua actividade tem vindo a ser estudada e inclui actividades antimicrobiana, opióide, inibidora do enzima de conversão da angiotensina (ACE) e a nível do funcionamento do íleo. (Steele, 2004)

As proteínas não são o único valor nutricional do soro. Não devemos esquecer que a lactose é um açúcar de fácil digestão que facilita a absorção de cálcio pelo organismo (Chandan & Kilara, 2013). O conjunto de proteínas, lactose e minerais existentes no soro formam um sistema alimentar de grande valor nutricional.

Com o advento de novas tecnologias e conhecimento, os componentes do soro têm sido considerados pelas suas propriedades funcionais para além do seu valor nutricional. As proteínas do soro têm propriedades emulsionantes, espumantes e gelificantes que podem ser utilizadas na formulação de produtos melhorando o processo de fabrico ou as características do produto final. No entanto, estas propriedades intrínsecas das proteínas são altamente dependentes de factores extrínsecos como o pH, a temperatura, a acidez e a presença de certos minerais, bem como os processos a que as proteínas são submetidas (homogeneização, aquecimento, congelamento) e a interacção com outros componentes do sistema alimentar onde são inseridas (lípidos, açúcares, sais e outras proteínas). (De Wit, 1998)

Os emulsionantes alimentares são substâncias tensioactivas, que contêm porções hidrofílicas e hidrofóbicas, e são classificados como iónicos ou não iónicos. As proteínas do soro são compostos poli-iónicos, mas com a desvantagem de que podem reagir com vários outros iões em alimentos. As proteínas de soja e caseínas têm propriedades de emulsão mais elevadas do que as do soro, o que significa que conseguem incorporar uma maior quantidade de óleo na menor quantidade de proteína. A superfície de adsorção das proteínas do soro nos glóbulos de gordura é altamente dependente do pH, e a resistência ao calor das emulsões estabilizadas por proteínas de soro é reduzida com a adição de sais de cálcio. As proteínas de soro individuais diferem nas suas características de adsorção de gordura, sendo que, a pH 7,0 a β -Lg, as Ig e a lactoferrina são absorvidas preferencialmente, mas baixando o pH aumenta a adsorção da α -La e diminui a adsorção da β -Lg. (Schmidt, *et al.*, 1984; Zall, 1992)

Propriedades de formação de espuma dependem da habilidade das proteínas se desdobrarem e orientarem na interface ar-água. As propriedades espumantes (PE) das proteínas do soro são bastante imprevisíveis pois dependem de muitos factores, entre os quais: a sua concentração (óptima a cerca de 10%), a presença de sais de cálcio que podem induzir agregação das proteínas, o potencial redox (sendo que a presença de oxidantes tende a melhorar as PE e a de redutores a inibi-las), e o estado de desnaturação das proteínas. A presença de sucrose, lípidos residuais, surfactantes, bem como o pH, o tempo de batimento e a forma de batimento, são outros factores que influenciam a estabilidade das espumas formadas. (Schmidt, *et al.*, 1984; Zall, 1992)

Uma das propriedades mais interessantes das proteínas do soro é a sua capacidade para reter a água depois de desnaturadas. Nas condições adequadas, forma-se uma matriz

tridimensional com grande capacidade de retenção de água. Estas propriedades de gelificação têm sido estudadas e observou-se uma concentração óptima para gelificação de cerca de 15% de proteína, formando geles firmes a pH neutros e alcalinos, que não revertem por temperatura ou pH. As aplicações em sistemas alimentares são diversas, tais como formulações à base de carne e substituição de clara de ovo, mas a principal aplicação é em alimentos lácteos, principalmente em iogurte sólido em que pode prevenir a separação do soro. No entanto, para este fim a proteína do soro deve ser o mais pura possível (desionizada, clarificada) de forma a não alterar as características desejadas no produto final. (Lucey & Singh, 1997; Zall, 1992)

Estas propriedades funcionais das proteínas do soro são também afectadas pelas condições de fabrico do produto de onde provêm, condições de tratamento térmico de estabilização, eventuais condições de fraccionamento e isolamento, e até as condições de armazenamento. Assim, os métodos de processamento do soro devem ser cuidadosamente seleccionados. Modificações de processo, tais como tratamento selectivo de calor, desmineralização ou de permuta iónica selectiva, e hidrólise proteolítica enzimática podem alterar a possibilidade de aplicação para um determinado fim. (Schmidt, *et al.*, 1984)

3.3. Processamento do soro

A valorização do soro pelos seus componentes dá origem a uma série de produtos com características e funcionalidades diferentes. A Figura I.3 resume as principais vias de valorização dos componentes do soro e os respectivos produtos.

A desmineralização do soro é muitas vezes feita pois o elevado conteúdo de cinza é, na maior parte dos casos, o principal obstáculo à sua utilização. A desmineralização pode ser efectuada por nanofiltração produzindo um soro adequado para incorporar em gelados e produtos de panificação, ou por electrodiálise ou permuta iónica, caso em que a desmineralização é mais completa e o resultado pode ser utilizado em alimentação para bebés, incluindo leite de amamentação. A remoção do cálcio em particular trás grandes vantagens a nível das funcionalidades das proteínas. (Morr, 1992)

A ultrafiltração permite a remoção das proteínas do soro, que podem ser utilizadas em forma de concentrado ou, após secagem, em forma de pó. Estes concentrados ou pó de proteínas de soro, especialmente se forem desmineralizados, têm grande interesse como proteínas funcionais em emulsões, geles e espumas. (Siso, 1996) O outro resultado da ultrafiltração é o permeado de soro, também chamado de soro desproteínado, e que pode ser usado de várias formas para valorização da lactose. A lactose pode ser convertida química ou biologicamente em vários compostos com valor comercial, como apresentado na Figura I.3 (ver também Capítulo IV). No entanto, uma das utilizações mais generalizadas do soro e do permeado de soro é a formação de molassos, por concentração a 40% de sólidos, que são então usados para alimentação animal. Após uma concentração a 30-40% de sólidos, a lactose pode ser cristalizada e purificada, podendo então ter outros usos. (Siso, 1996; Smithers, 2008)

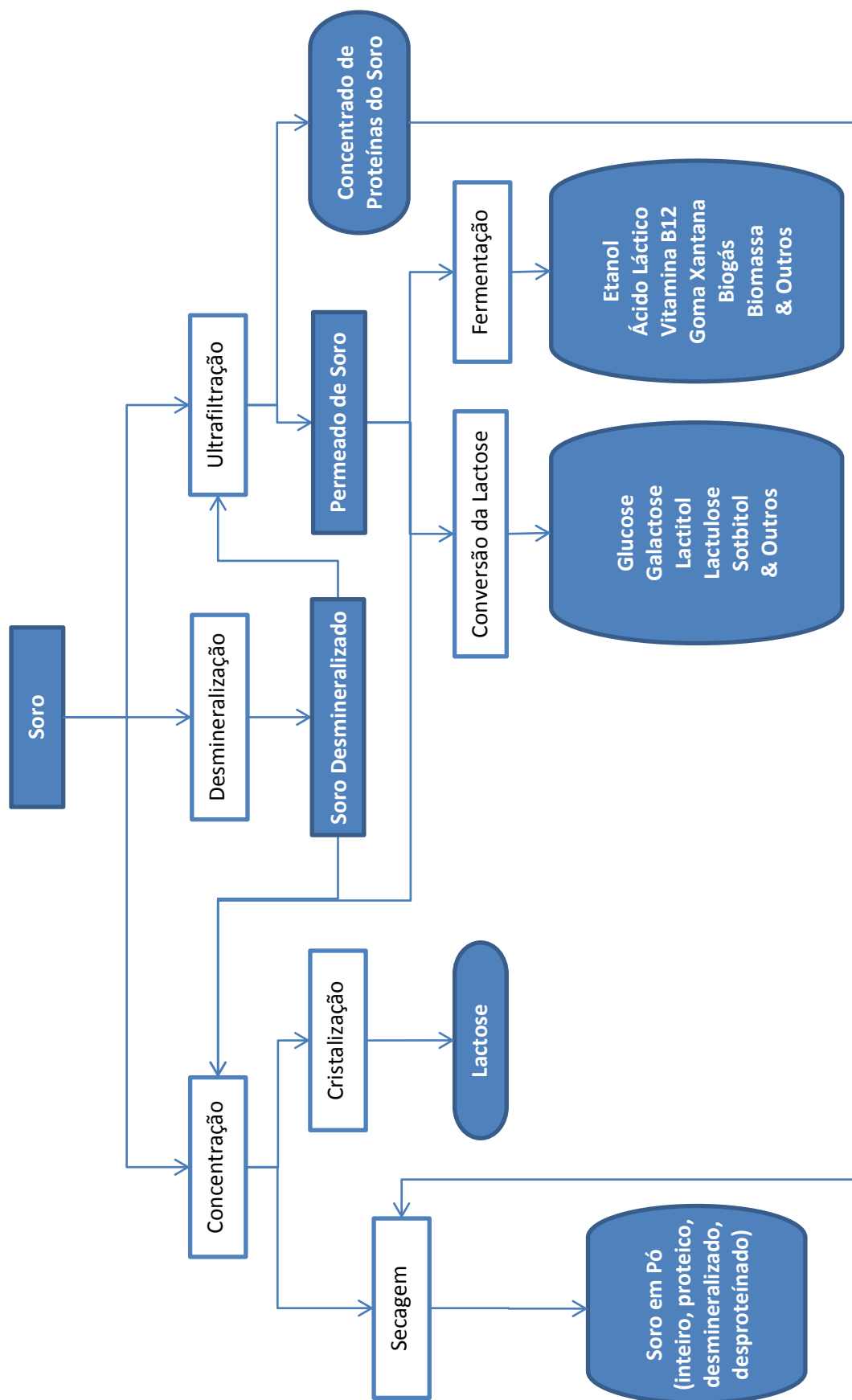


Figura 1.3 - Esquema resumo dos principais tratamentos aplicados ao soro e seus produtos

Adaptado de Bylund (1995) e Siso (1996).

Qualquer fracção do soro pode ser tornada em pó por secagem, aumentando assim a sua durabilidade e reduzindo custos de transporte. Nos países onde é legalmente permitido, pode ser adicionado um conservante ao soro, tipicamente 0,4% de bissulfito de sódio, ou 0,2% de peróxido de hidrogénio a 30%. Para melhorar a qualidade e longevidade do produto, é importante que o soro seja processado assim que é recolhido, ou mantido abaixo de 5 °C quando em bruto. (Bylund, 1995)

4. Avaliação da estabilidade

A deterioração dos alimentos pode ser definida de várias maneiras diferentes. Geralmente, um alimento é considerado estragado quando já não é aceitável para o consumidor. Apesar da sua importância, não existe na literatura uma definição simples e geralmente aceite de período de vida útil dum alimento. Na Tabela I.3 encontram-se listadas várias definições oferecidas por organizações oficiais, que têm em comum três factores que influenciam o período de vida útil dum produto: (a) segurança alimentar, (b) retenção das propriedades físicas, químicas e nutricionais e (c) aceitação do consumidor.

Tabela I.3 - Definições de período de vida útil dum alimento

Organização	Definição de período de vida útil	Fonte
<i>Codex Alimentarius</i>	"O período durante o qual um alimento conserva a sua segurança e adequação microbiológica, a uma dada temperatura de armazenamento e, quando necessário, a determinadas condições de armazenamento e processamento"	(DEFRA, FSA, 2011)
União Europeia	"Período correspondente ao intervalo de tempo que precede a data limite de consumo dos produtos, ou a data de durabilidade mínima, conforme definidas nos artigos 9º e 10º da Directiva 2000/13/CE"	(Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão, 2005)
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (UK)	"O período durante o qual o produto alimentar permanecerá seguro; se presume que retenha as características sensoriais, químicas, físicas, microbiológicas e funcionais desejadas; e cumpra com qualquer declaração no rótulo sobre dados nutricionais, quando armazenado nas condições recomendadas"	(Robertson, 2009)
Instituto de Tecnólogos de Alimentos (EUA)	"O período entre a produção e a compra de retalho de um produto alimentar, durante o qual o produto está num estado de qualidade satisfatória em termos de valor nutricional, sabor, textura e aparência"	(Robertson, 2009)

(a) O pior caso de deterioração é quando se torna uma questão de segurança alimentar, em que o produto alimentar pode causar doença no consumidor ou até mesmo a morte. Estes casos dão-se quando ocorre contaminação do alimento por microrganismos patogénicos que, quando encontram condições favoráveis ao seu desenvolvimento, podem multiplicar-se até valores

inaceitáveis e/ou produzir toxinas que persistem no alimento mesmo após tratamento térmico. Esta situação evita-se eliminando fontes de contaminação segundo os princípios do HACCP (análise de riscos e pontos críticos de controlo), aplicando tratamento de conservação adequado à inactivação ou eliminação destes microrganismos e suas toxinas, e, conforme adequado, efectuando análises microbiológicas que garantam a eficácia das medidas implementadas. A presença de microrganismos, patogénicos ou não patogénicos, pode também contribuir para a degradação físico-química do alimento, bem como alterações nas propriedades físico-químicas podem modificar as condições de crescimento microbiano. O soro de iogurte, dado o seu baixo pH, não oferece as melhores condições para o desenvolvimento dos principais agentes patogénicos, e o controlo específico da sua presença e crescimento no produto encontra-se fora do âmbito deste trabalho.

(b) Outro caso de deterioração ocorre quando nutrientes do alimento (por exemplo, conteúdo de vitamina) se deterioraram a tal ponto que o produto alimentar já não satisfaz o seu valor nutricional declarado. Trata-se da alteração de características do alimento que podem ocorrer por alterações físicas (p. ex. temperatura), químicas (p. ex. reacções entre componentes do alimento) ou microbiológicas (p. ex. degradação de componentes pelos microrganismos). De acordo com Steele (2004), os principais mecanismos de deterioração em produtos lácteos são a oxidação, a rancificação e a cristalização da lactose, pelo que a presença de oxigénio, luz solar e temperatura de armazenagem são variáveis importantes na conservação destes produtos.

(c) Casos menos graves de deterioração dos alimentos podem ser simplesmente que a cor, sabor, textura, ou aroma do alimento se deteriorou a tal ponto que já não é aceitável para o consumidor. A avaliação da estabilidade dum produto em relação a estas características deve ser efectuada por testes sensoriais no produto acabado. No entanto, estas alterações são muitas vezes uma consequência de alterações físicas e químicas ou de crescimento de microrganismos no produto.

O tempo que leva para um produto alimentar atingir uma destas condições de deterioração é o geralmente denominado período de vida útil do produto. O período de vida útil pode ser estimado considerando dados publicados na literatura referentes ao produto em questão ou a produtos semelhantes, ou avaliando as práticas do mercado, legislação e registos de reclamações de consumidores. (Steele, 2004)

Os lípidos são em geral o constituinte menos estável dos alimentos, e são susceptíveis a oxidação rancificativa com produção de ácidos butírico e hexanóico que dão um aroma indesejável ao produto, além de poderem gerar radicais livres no processo autolítico que promovem a perda de vitaminas, alteração da cor ou degradação de proteínas (Steele, 2004). No entanto, o soro de iogurte terá tipicamente muito poucos lípidos, dado que a gordura do leite fica na quase totalidade retida no coágulo, pelo que a análise da lipólise do soro será desnecessária (Bylund, 1995).

Já a degradação das proteínas deverá ser analisada, dado que o leite possui enzimas proteolíticas endógenos, aos quais acresce os enzimas produzidos por microrganismos, e

também vitaminas que são sensíveis à acção da luz. Os vários métodos de avaliação da proteólise aplicáveis ao soro de iogurte são discutidos na secção 4.2 deste Capítulo.

As análises microbiológicas e físico-químicas são amplamente usadas nos estudos de alimentos. Nos métodos clássicos de análise microbiológica de alimentos, destacam-se a contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C e a contagem de *Enterobacteriaceae*, que constituem indicadores gerais de higiene do alimento. No entanto, a acidez e pH do soro de iogurte é tal que não se espera o desenvolvimento de *Enterobacteriaceae*, e o mesmo se aplica a microrganismos patogénicos como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Já os bolores e leveduras deverão ser analisados, visto crescerem nas condições físico-químicas do produto, como se discute na secção seguinte.

4.1. Desenvolvimento microbiológico

Os microrganismos de degradação dos alimentos podem incluir bactérias, fungos (bolores e leveduras – B&L), vírus e parasitas. O crescimento da maioria dos microrganismos pode ser impedido ou retardado, ajustando a carga microbiana inicial, a temperatura de armazenamento, reduzindo a actividade da água, diminuindo o pH, por utilização de conservantes, e/ou embalagem adequada. Os passos a tomar para prevenir a degradação por microrganismos dependem do produto e suas características.

O soro de leite em bruto não é comercializado para o consumidor final, pelo que não existem indicadores de qualidade microbiológica estabelecidos. A Portaria nº 742/92 especifica características e limites microbiológicos para o iogurte, que poderão servir de guia. São definidos valores máximos para coliformes (negativo em 1 cm³), bolores (máximo 10 UFC cm⁻³) e leveduras (máximo 100 UFC cm⁻³). Quando se tratam de iogurtes com fruta ou açúcares adicionados, os valores limites de B&L são elevados para o dobro, dado que a adição de frutas é geralmente a principal fonte deste tipo de contaminação. A presença de B&L em valores superiores aos referidos significa geralmente que o iogurte se irá deteriorar antes do final do tempo de vida útil (cerca de 30 dias em refrigeração). (Moreira, *et al.*, 2001)

O crescimento de B&L é um problema conhecido nos lacticínios que pode ser atribuído à sua capacidade de crescimento a baixas temperaturas, de assimilar/fermentar a lactose, de assimilar ácidos orgânicos como os sucínico, láctico e cítrico, à sua actividade lipolítica e proteolítica e resistência a concentrações elevadas de sal. As contaminações por leveduras nos equipamentos e ar ambiente nas instalações de indústrias de lacticínios têm sido detectadas com frequência. Trata-se duma preocupação premente nestas indústrias visto que a sua resistência a agentes de limpeza as torna muito difíceis de eliminar. (Viljoen, 2001)

No caso da indústria de iogurtes, devido à adição ou processamento paralelo de frutas, a contaminação por B&L é elevada, em especial por *Saccharomyces cerevisiae*. Outras leveduras comuns em iogurte são *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida* espécies *lusitaniae* e *krusei*. (Steele, 2004; Viljoen, 2001) Fungos como *Alternaria* spp. ou *Aspergillus* spp. podem arruinar a aparência do iogurte sólido, mas em iogurtes batidos as condições raramente são aeróbicas o suficiente para permitir um desenvolvimento detectável. (Tamime, 2006)

A deterioração por leveduras manifesta-se por um crescimento visível formando um filme ou lodo na superfície do produto, por produção de gás, desenvolvimento de odores e/ou sabores desagradáveis, e causando turvação e sedimentação nos produtos líquidos (Steele, 2004). Apesar de no queijo os B&L não serem a principal causa de deterioração nos iogurtes, estes organismos são responsáveis por *off-flavours* inaceitáveis, perda de textura por produção de gás, e pelo fenómeno de colapso das embalagens (Moreira, *et al.*, 2001).

Os produtos lácteos representam nichos ecológicos específicos para B&L devido a pH relativamente baixo, alta concentração de sal e baixa temperatura de armazenamento. Sob estas condições só podem crescer microrganismos que sejam capazes de utilizar a lactose e que possuam actividade proteolítica e/ou lipolítica. Os B&L possuem estas características, mas os seus enzimas lipolíticos e proteolíticos raramente são activos o suficiente para causar hidrólise extensa das proteínas e lípidos presentes nos lacticínios. As espécies de B&L consideradas como tendo capacidade de deterioração dos alimentos representam uma minoria das espécies de contaminação, e as boas práticas de fabrico conseguem limitar ainda mais este grupo. No iogurte, no entanto, a detecção e contagem de B&L são essenciais ao controlo da qualidade, dada a sua sensibilidade aos seus efeitos prejudiciais e facilidade de contaminação através das frutas e açúcar adicionados. O facto de não se conhecerem leveduras patogénicas transmitidas por alimentos faz com que, apesar disso, o iogurte seja considerado um produto relativamente seguro do ponto de vista da saúde pública. (Steele, 2004; Tamime, 2006)

4.2. Proteólise

Dado o elevado conteúdo proteico e a importância biológica e funcional das proteínas do soro, uma importante alteração a monitorizar é o grau de proteólise em função do tempo de armazenagem. A proteólise, para além de afectar o desempenho funcional das proteínas (Johansen, *et al.*, 2002), pode ainda afectar o *flavour* por produção de aminoácidos livres, pequenos péptidos e precursores de compostos voláteis (McSweeney & Fox, 1997).

Os principais agentes proteolíticos são enzimas que podem ter origem no próprio leite ou nas bactérias utilizadas como *starter* no fabrico do iogurte. A principal proteinase presente no leite é a plasmina, que pode sobreviver às temperaturas de pasteurização, havendo também outras proteinases derivadas da microflora natural do leite. No *starter*, o *Lactobacillus* spp. e o *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* possuem sistemas de proteinases e peptidases complexos que contribuem para a proteólise do soro, em especial na produção de peptídeos curtos e aminoácidos livres. (McSweeney & Fox, 1997; Steele, 2004)

É comum considerar-se a proteólise de lacticínios em duas fases sequenciais. Considera-se como “extensão da proteólise” a hidrólise primária das proteínas, na qual há a produção de péptidos longos, eventualmente insolúveis em água, e médios, solúveis em água, que podem ser posteriormente degradados. Esta hidrólise tem como principal responsável a plasmina (e no queijo também os enzimas do agente coagulante) e é geralmente medida a partir do quociente entre azoto solúvel em água e azoto total. A proteólise secundária, ou “profundidade da proteólise”, ocorre principalmente pela acção das proteinases e peptidases da flora microbiana (nativa e do *starter*), e corresponde à degradação subsequente dos péptidos em péptidos de

cadeia curta e aminoácidos livres. Pode ser avaliada a partir da relação entre o azoto não proteico (APN) e o azoto total ou, caso se pretenda uma avaliação qualitativa, por fraccionamento e análise das fracções azotadas por cromatografia líquida de alta eficiência. (Alvarenga, 2008; Soares, 2013)

O fraccionamento do azoto conforme o tamanho dos peptídeos por via da sua solubilidade em diferentes solventes é o método mais utilizado para avaliar a extensão e profundidade da proteólise. O azoto nas diversas fracções é então determinado pelo método de Kjeldahl. Neste trabalho optou-se por avaliar o azoto solúvel em água e azoto não proteico (solúvel em ácido tricloroacético – TCA), bem como o azoto amoniacal, todos discutidos de seguida.

Azoto amoniacal

A desaminação de aminoácidos produz amónia e altera características importantes nos alimentos em termos de *flavour* e textura, devido à neutralização da acidez. Este é um indicador de proteólise mas não é muito usado para esse fim, sendo preterido em favor da medição mais simples do pH. (McSweeney & Fox, 1997) No caso do soro bruto, no entanto, poderá se registar uma alteração de pH por razões que não a proteólise (por exemplo, por acção das LAB), pelo que este indicador permite esclarecer os mecanismos por trás das alterações a observar. Alterações no azoto amoniacal podem ainda ser indicativas de alterações de *flavour* que poderão influenciar a valorização do soro em bruto por incorporação em bebidas.

Azoto solúvel em água

O teor de azoto solúvel em água é muitas vezes utilizado para avaliar o grau de maturação de queijos. A fracção de azoto solúvel em água, nesse contexto, é composta maioritariamente por péptidos pequenos a médios, aminoácidos livres e os produtos da sua degradação, e ácidos orgânicos e os seus sais. (McSweeney & Fox, 1997) No contexto do soro líquido, no entanto, a maioria das proteínas presentes são solúveis em água, e a avaliação deste teor ao longo do tempo dá-nos mais uma medida da perda de solubilidade das proteínas do que o contrário. Esta perda de solubilidade pode ser devido a alterações conformacionais ligadas à proteólise, à desnaturação térmica, ou à alteração de outros parâmetros importantes como pH e força iónica. Alterações numa das proteínas presentes podem ainda ter influência noutras proteínas, criando ou quebrando ligações entre estas e causando a sua floculação. Estas alterações, em particular a alteração da solubilidade, estão directamente correlacionadas com as capacidades espumantes e emulsionantes das proteínas. A solubilidade é considerada uma medida da desnaturação das proteínas do soro. (Schmidt, *et al.*, 1984; Yamauchi, *et al.*, 1980)

Azoto não proteico (APN)

Para determinar o APN é largamente usado um fraccionamento com TCA, dado que diferentes fracções proteicas precipitam a determinadas concentrações de TCA, sendo usadas concentrações entre 2 e 12% conforme o objectivo. Quanto maior o peptídeo, menos solúvel é em TCA. Yvon *et al.* (1989) observaram que, a concentrações de 12%, todos os peptídeos com menos de cerca de 7 aminoácidos são solúveis e é geralmente aceite que, a esta concentração de TCA, se encontrarão péptidos com entre 2 a 20 aminoácidos (a solubilidade dos peptídeos está relacionada com a sua hidrofobicidade). A fracção solúvel pode então ser determinada pelo

método de Kjeldahl e comparada com o azoto total e a sua evolução ao longo do tempo de armazenagem é indicativa da degradação das proteínas. (McSweeney & Fox, 1997; Soares, 2013)

5. Avaliação das propriedades funcionais

As proteínas podem servir para diversos fins não-nutritivos em alimentos, mas a função mais comum é contribuir para a estrutura dos alimentos a nível molecular. A capacidade de formar e/ou estabilizar as estruturas reticulares (geles e filmes), espumas, emulsões e soluções coloidais são as principais propriedades funcionais das proteínas. (Foegeding & Davis, 2011)

As proteínas do soro são bem conhecidas pelas suas propriedades funcionais. O uso de concentrados de proteína de soro de leite com este fim representa uma das utilizações mais comuns das proteínas de soro, com especial expressão nas indústrias de lacticínios, panificação e misturas em pó. As propriedades funcionais mais comuns atribuídas aos concentrados de proteínas do soro são: solubilidade, viscosidade, emulsificação, formação de espuma, absorção de água e gelificação. (De Wit, 1998; Sanmartín, *et al.*, 2012; Zall, 1992)

A estrutura tridimensional das proteínas pode dar uma perspectiva das propriedades funcionais esperadas, mas as proteínas alteram a sua estrutura de acordo com as características do sistema alimentar em que são inseridas. A alteração da estrutura das proteínas (desnaturação) deve ser vista em dois passos: um equilíbrio entre a estrutura nativa e a cadeia desdobrada, seguido de reacções de agregação com outras espécies presentes no meio (incluindo outras proteínas), ou duma clivagem irreversível da cadeia proteica. As propriedades funcionais das proteínas variam com cada alteração de estrutura sofrida e com as espécies presentes no sistema alimentar, pelo que o estudo do seu comportamento em diversas condições é fundamental para prever o seu desempenho nos alimentos. (Foegeding & Davis, 2011; De Wit & Klarenbeek, 1984)

A abordagem mais simples para entender a funcionalidade duma proteína é examinar soluções dessa proteína isolada. Por exemplo, β -Lg é uma das proteínas alimentares mais estudadas em relação à funcionalidade. No entanto, as proteínas disponíveis para integração em alimentos são geralmente uma mistura de proteínas e outras moléculas tais como os açúcares e sais minerais (e as proteínas do soro de leite são disso o melhor exemplo). Além disso, uma proteína adicionada a uma fórmula será um de vários ingredientes presentes no alimento e, por conseguinte, a sua funcionalidade irá depender das suas propriedades nesse sistema alimentar complexo. (Foegeding & Davis, 2011)

Assim, existe uma considerável variação nas propriedades funcionais dos concentrados de proteína de soro de leite, dependendo da sua origem (que determina a sua composição) e do processamento aplicado ao soro (que altera também a composição, mas principalmente o estado de desnaturação das proteínas). Os vários processos de preservação e separação de componentes do soro, representados na Figura 1.3 (secção 3.3 deste capítulo), produzem concentrados de soro ou soro em pó com diferentes propriedades e aplicações. (Zall, 1992)

Neste trabalho pretende-se caracterizar um soro de leite específico (soro de iogurte do tipo grego) com vista à sua valorização na forma não processada ou com um processamento mínimo. Não se encontram na literatura muitos estudos sobre a utilização de soro nestas condições, pelo que avaliar algumas das suas propriedades funcionais permite apreciar a possibilidade da sua utilização como elemento funcional dum alimento. Para tal, escolheu-se avaliar duas das propriedades das proteínas do soro mais estudadas na literatura: as propriedades espumantes e emulsionantes. O estudo das propriedades de gelificação² foi posto de parte, considerando que as proteínas do soro utilizadas para esse fim são quase exclusivamente utilizadas na forma de soro em pó, para a aumento do teor de sólidos-não-gordura do leite em gelados e sobremesas lácteas (Morr, 1992).

Para compreender as propriedades espumantes e emulsionantes das proteínas do soro, é necessário compreender a importância da sua solubilidade e estado de desnaturação. A completa solubilidade das proteínas é um requisito para a sua funcionalidade pois a capacidade de estabelecer ligações com as outras moléculas presentes no meio é dependente da sua capacidade de se reorientar no solvente (Zall, 1992). O seu estado de desnaturação influencia a exposição dos grupos laterais da cadeia proteica que podem efectuar ligações (hidrofóbicas ou pontes de hidrogénio ou enxofre) com outras moléculas presentes (De Wit & Klarenbeek, 1984).

Para obter as características de formação de espuma e emulsionantes ideais, as proteínas devem ser substancialmente solúveis, difundir-se para a interface recém-formada, desdobrarem-se e reorientarem-se de maneira que baixe a tensão interfacial, e formar filmes coesos e viscoelásticas por polimerização principalmente via pontes de enxofre e interações hidrofóbicas (Dissanayake & Vasiljevic, 2009). São estas interações, que resultam na formação de complexos com pesos moleculares mais elevados, a que se referem os termos agregação, precipitação, coagulação e floculação (Patel, *et al.*, 2015).

Um agente emulsionante é aquele que tem a capacidade de estabilizar uma mistura de dois líquidos imiscíveis (por exemplo, óleo e água). O leite é por si uma emulsão de gordura láctea em água, estabilizada pelas caseínas e proteínas do soro. (Bylund, 1995; Patel, *et al.*, 2015) As proteínas do leite desempenham um papel chave na formação e estabilidade das emulsões. A actividade de superfície das proteínas do leite conduz à sua adsorção rápida na interface óleo-água durante a emulsificação, produzindo uma camada estabilizadora que protege as gotículas de óleo contra floculação ou coalescência. (Britten & Giroux, 1991)

Muitas proteínas, incluindo caseína, proteína de soja, proteína muscular, e proteína de ovo têm sido utilizadas em vários produtos alimentares emulsionados. A estabilização de emulsões por proteínas de soro de leite tem sido também alvo de vários estudos. (Yamauchi, *et al.*, 1980)

² A gelificação é um agregado ordenado de proteínas, formando uma estrutura reticular tridimensional, em que as interações proteína-proteína e proteína-solvente produzem uma matriz bem ordenada que é capaz de reter quantidades significativas de água (Patel, *et al.*, 2015). É o que acontece durante a coagulação do leite para a produção de iogurte ou queijo, por desnaturação da caseína. As proteínas do soro, quando desnaturam, formam geles com grande capacidade de retenção de água, mesmo em baixas concentrações de proteína (cerca de 15% de proteína em base húmida, 50% em base seca). (Zall, 1992)

Destes estudos, concluiu-se que o desempenho das proteínas do soro como agente emulsionante depende de factores extrínsecos que afectam os níveis de desnaturação, agregação e interacção proteína-proteína a nível molecular, e que incluem temperatura, concentração de proteína, pH, força iónica e do tipo de ião, condições de processamento, e de energia externa, tal como cisalhamento, calor, alta pressão ou de ultra-som. Factores intrínsecos à proteína incluem hidrofobicidade, interacções electrostáticas, ligações de enxofre, peso molecular e composição de aminoácidos. (Patel, *et al.*, 2015)

As espumas são definidas como dispersões de gás em líquido (G/L) ou de gás em sólidos (G/S). As estruturas de espuma são componentes de muitos alimentos, tais como o merengue (G/ L) e o pão (G/S). Na sua forma mais simples, uma espuma consiste numa bolha de gás rodeada por uma fase contínua. As proteínas situam-se na fase contínua e na interface, e distinguem-se dos surfactantes de baixo peso molecular por terem a capacidade de interagir com proteínas adsorvidas adjacentes para formar filmes que possuem boas propriedades interfaciais em termos de espessura, permeabilidade ao gás, e viscoelasticidade. (Foegeding & Davis, 2011)

As características das proteínas do soro que contribuem para um bom desempenho como agente espumante são: a flexibilidade das suas moléculas que permite a sua orientação na interface ar-líquido, expondo os seus centros hidrofóbicos na fase gasosa; e a criação de ligações variadas (pontes de hidrogénio e enxofre) com as outras moléculas da interface e da fase líquida, contribuindo para a resistência e viscoelasticidade da interface. (Schmidt, *et al.*, 1984) Os factores que afectam a capacidade de formação de espuma das proteínas incluem o teor de lípidos (mesmo que residual), teor de sólidos, pH, estado de desnaturação, força iónica e potencial redox do meio. A formação e estabilidade da espuma são ainda dependentes do tempo de batimento. (Zall, 1992)

A influência de todos estes factores no desempenho das proteínas tem sido um impedimento ao seu uso como elemento funcional dos alimentos (Foegeding & Davis, 2011). No entanto, a contribuição geral das proteínas do soro para nutrição e saúde, incluindo bioactividades específicas, torna estas proteínas apelativas à sua incorporação em produtos.

Capítulo II. Metodologia

1. A Yonest - True Yogurt

A Yonest True Yogurt, Lda é uma empresa 100% portuguesa, fundada em 2012 com o intuito de fabricar iogurtes caseiros do tipo grego. A marca Yonest foi registada em 2013 e criou uma oferta inovadora de iogurte grego para hotelaria, restauração e *catering*. Os produtos Yonest (Figura II.1) combinam-se em receitas acabadas de fazer que se adaptam à sua venda em cafés e restaurantes, bufês, e *self-service*. Os produtos podem também ser adquiridos em lojas e espaços *gourmet* (revendedores autorizados), no “Café Yogurtman”, ou *online*. (Yonest, 2015)



Figura II.1 - Alguns produtos da Yonest

A empresa possui uma fábrica em Venda do Pinheiro e uma banca de venda na Praça Duque de Saldanha, em Lisboa (“Café Yogurtman”) (Figura II.2). A “Mota Yogurtman” (Figura II.2) assegurou a presença da Yonest em eventos até Setembro de 2015.

A Yonest orgulha-se de usar os métodos tradicionais e não usar aditivos industriais ou natas, sendo o seu mote “fazer iogurtes honestamente simples e genuínos”. O iogurte é feito com leite de vaca “do dia”, gordo ou magro, e dessorado em filtros, à moda antiga.

Em conjunto com os iogurtes, os seus produtos incluem receitas caseiras de fruta e uma limonada proteica (“creme de limão”), em que o soro de iogurte é um dos ingredientes. A Yonest procura, no entanto, novas formas de utilização deste seu subproduto.



Figura II.2 – Pontos de venda da Yonest: Moto Yogurtman (esquerda) e Café Yogurtman (direita)

2. Projecto experimental

Uma caracterização do soro, essencial para enquadrar a avaliação da sua estabilidade e possibilidades de valorização, deverá compreender os parâmetros de composição genéricos (matéria seca, cinza, lípidos, proteína e açúcares), e parâmetros de importância específica para os produtos lácteos (pH, acidez titulável – expressa em gramas de ácido lácteo, teor de cálcio, sódio e cloretos).

Tal como indicado anteriormente, a composição da cinza tem grande influência nas propriedades funcionais do soro, pelo que foi também um parâmetro incluído na lista de análises a realizar. Nesta caracterização preliminar não foi possível incluir a avaliação do conteúdo vitamínico, que terá importância comercial, dependendo da utilização que venha a ser dada ao soro (eventual degradação das vitaminas pelo tratamento térmico ou durante a armazenagem terá também de ser estudada).

A escolha dos métodos de análise da composição foi linear, dado existirem métodos padronizados que, sendo vulgarmente utilizados, permitem comparação com os dados obtidos na literatura. Entre os parâmetros escolhidos para análise, encontram-se alguns dos definidos na legislação da rotulagem (Regulamento (UE) N. 1169/2011, 2011).

Os tratamentos térmicos seleccionados para o estudo e subsequente avaliação da estabilização tiveram em conta a importância nutricional das proteínas do soro e as possibilidades espectáveis dum pequeno produtor de iogurte do tipo grego. A primeira escolha de tratamento foi, portanto, a chamada “pasteurização lenta” do leite, que é efectuada a 63-65 °C por 30 minutos, geralmente em *batch*. A temperatura de 63 °C (P63) é escolhida por não desnaturar irreversivelmente as proteínas do soro, o que é crucial para a sua valorização. Esta pasteurização, apesar de ser a mais praticável para um pequeno produtor, não é geralmente usada, por não ser muito económica. A nível industrial é usualmente usada uma pasteurização em permutador de calor que pode ser efectuada a 72-75 °C por 15-20 segundos, ou a temperatura superior a 80 °C por 1-5 segundos (temperaturas superiores a 100 °C são também

usadas na chamada ultrapasteurização). Estes binómios temperatura/tempo foram assim escolhidos por minimizarem a desnaturação das proteínas sem perda de eficiência na redução da carga microbiológica, o que é importante tendo em vista a valorização do soro. (Bylund, 1995)

Para este trabalho, por não haver possibilidade de utilização dum permutador de calor, optou-se por um tratamento térmico a 72 °C em *batch*, em que a amostra foi imersa no banho por 1 minuto (P72), para comparar com a pasteurização lenta de 63 °C por 30 minutos, bem como com o soro sem pasteurização. Optou-se por desdobrar a pasteurização lenta (P63) em três condições de armazenagem: congelação (-18 °C), frigorífico (+4 °C) e temperatura ambiente (+20 °C). Para o soro tratado a 72 °C (P72) e o soro sem pasteurização (SP) optou-se por uma armazenagem a 4 °C (frigorífico), que é a mais empregue em produtos lácteos.

Na decisão do período de tempo a analisar, pesou o tempo de vida útil espectável do produto, considerando a sua origem, e o tempo de vida útil pretendido com o tratamento. Assim, o soro SP foi avaliado ao longo de 3 semanas – o tempo de vida útil dum iogurte artesanal. Já o soro pasteurizado foi avaliado ao longo de 3 meses, com excepção do soro armazenado à temperatura ambiente que foi avaliado por apenas 3 semanas.

A avaliação da estabilidade incidiu em três aspectos: proteólise, desenvolvimento microbiológico e alterações físico-químicas (pH, acidez e °Brix), de acordo com os aspectos já referidos nas secções 4.1 e 4.2 do Capítulo I.

Finalmente, decidiu-se analisar as propriedades espumantes e emulsionantes do soro, gordo e magro, sem e com pasteurização, para avaliar preliminarmente a potencialidade do produto como componente funcional de alimentos.

3. Produção do soro de iogurte

O soro de iogurte foi produzido pela *Yonest – True Yogurt* (ver secção 1 deste capítulo), partindo de leite “do dia” gordo ou magro, para a produção de iogurte do tipo grego (gordo ou magro). O processo foi o descrito na secção 2.1 do Capítulo I, sumariado na Figura I.1 - Processo de produção do iogurte do tipo grego (gordo e magro).

O pré-tratamento aplicado ao leite para o fabrico do iogurte foi de 68-70 °C para o leite gordo e 55-57 °C para o leite magro. Foi utilizado um *Starter* comercial YF-L903 Yo-Flex® consistindo numa mistura de *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* para incubação a 40-45 °C por 16 horas. O dessoramento foi efectuado por acção da gravidade em filtros, sendo o soro recolhido em tabuleiros de inox.

4. Amostragem e pasteurização

As amostras de soro foram recolhidas nas instalações da *Yonest*, imediatamente após o dessoramento. O soro recolhido foi homogeneizado, transferido para frascos de 100 mL ou 1 L, e pasteurizado às temperaturas definidas (ver Tabela II.1).

Tabela II.1 - Dias de armazenagem das várias amostras

Código	Pasteurização 63 °C, 30 min.	Dias de armazenagem
P63/-18°C	Armazenagem: - 18 °C	0, 27, 56, 90
P63/4°C	Armazenagem: + 4 °C	0, 7, 14, 21, 42, 62, 90
P63/20°C	Armazenagem: + 20 °C	0, 3, 7, 9, 13, 17, 21
Pasteurização 72 °C, 1 min.		
P72/4°C	Armazenagem: + 4 °C	0, 7, 14, 21, 42, 62, 90
Sem Pasteurização		
SP/4°C	Armazenagem: + 4 °C	0, 3, 7, 9, 13, 17, 21

A pasteurização foi realizada em processo descontínuo, num equipamento Magnus MEI 150.M990 (Figura II.3), com o auxílio dum termómetro Thermo Manager HDT-1 para leitura da temperatura do banho. As amostras foram então transportadas em mala térmica (4 °C) para a Faculdade de Ciência e Tecnologia da UNL, onde foram armazenadas nas condições apropriadas até à data da análise.



Figura II.3 - Equipamento onde foi realizada a pasteurização

As amostras destinadas à caracterização do soro (de leite gordo e magro) foram recolhidas em Fevereiro e Março de 2015 e pasteurizadas a 63 °C por 30 minutos em frascos de 1 litro e guardadas em refrigeração (4 °C) até análise. Utilizaram-se amostras obtidas de dois lotes diferentes e cada lote foi analisado em duplicado. As amostras pasteurizadas e sem pasteurização destinadas à avaliação da estabilidade do soro (todas de soro de leite gordo) foram recolhidas em frascos de 100 mL entre Março e Abril de 2015 e armazenadas às temperaturas definidas, durante os dias apresentados na Tabela II.1. O estudo de avaliação da estabilidade foi também realizado em dois lotes diferentes. No caso das análises físico-químicas,

cada amostra de cada lote foi analisada em duplicado. Na análise microbiológica os resultados correspondem à média dos dois lotes analisados para cada tempo de armazenamento, tendo sido cada lote analisado em relação à amostra e/ou suas diluições. Finalmente em Julho de 2015 foram recolhidas amostras de soro de leite gordo e magro para avaliação das propriedades funcionais. Estas análises foram realizadas em amostras de dois lotes diferentes.

5. Caracterização do soro

5.1. pH, acidez e condutividade

O pH foi determinado através dum medidor de pH CRISON micro pH 2001, devidamente calibrado com padrões de pH 7 e 4 antes de cada utilização.

A acidez foi medida pelo método de titulação volumétrica com NaOH, tendo os resultados sido expressos em equivalentes de ácido láctico (g L^{-1}). (AOAC, 1990)

Para a medição da condutividade utilizou-se um aparelho Mettler Toledo MC226, obtendo-se a leitura em mS cm^{-1} .

5.2. Matéria seca e cinza

Para a determinação da matéria seca e cinza seguiu-se o método AOAC (1990). Sumariamente, pesaram-se as cápsulas submetidas a 1 hora numa mufla Heraeus Electronic a 550 ± 50 °C e arrefecidas num exsiccador, e evaporaram -se 100 ml de amostra em cada cápsula em banho-maria. Utilizou-se uma estufa WTB binder E28 a 103 ± 2 °C durante 2 horas para secar a matéria residual. As cápsulas foram então pesadas determinando-se a matéria seca por diferença de peso.

As cápsulas contendo a matéria seca foram de novo à mufla durante 2 horas, sendo depois arrefecidas e pesadas, tendo-se determinado a cinza por diferença de peso.

Os resultados da matéria seca e da cinza foram expressos em g L^{-1} .

Foi utilizada uma balança Mettler Toledo AB204 em todas as pesagens.

5.3. Lípidos

A matéria gorda foi determinada pelo método gravimétrico (AOAC, 1990). Uma toma de 100 mL de soro foi misturada com 2 mL de amónia concentrada (NH_3 25% m/m) e a mistura aquecida a 60 ± 5 °C por 10 minutos agitando de vez em quando. A mistura foi neutralizada com HCl (37% m/m). Em seguida, juntaram-se 10 mL de HCl (37% m/m), cobriu-se o recipiente com vidro de relógio e aqueceu-se à ebulição durante 5 minutos. Deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e transferiu-se a mistura para ampola de decantação. Adicionaram-se 10 mL de etanol à mistura para lavagem, conjuntamente com 25 mL de hexano. Após repouso da mistura, procedeu-se à decantação, com a separação da fase aquosa da orgânica. Repetiu-se o processo com a fracção aquosa por duas vezes com 5 mL de etanol e 15 mL de hexano.

A fracção orgânica foi transferida para balões tarados, evaporada em banho de água e seca em estufa WTB binder E28 a 103 ± 2 °C durante 2 horas e pesada, depois de arrefecimento à temperatura ambiente e em exsicador (balança Mettler Toledo AB204). O teor de matéria gorda foi calculado por diferença de pesos e expresso em g L^{-1} .

5.4. Açúcares

O teor de açúcares redutores foi determinado com base na técnica de Munson e Walker descrita na norma NP 675 (1986) com algumas modificações. Este método permite a determinação de lactose em leites e leites em pó.

Resumidamente, a 50 mL de amostra adicionaram-se 12,5 ml de solução de Carrez I ($150 \text{ g K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O L}^{-1}$) e 12,5 ml da solução de Carrez II ($300 \text{ g ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O L}^{-1}$), agitou-se e perpez-se a 200 mL. A mistura foi homogeneizada e filtrada para a remoção do precipitado branco formado.

Juntaram-se 25 ml de sulfato de cobre ($69,278 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O L}^{-1}$) e 25 ml de solução alcalina tartárica ($346 \text{ g KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + 100 \text{ g NaOH L}^{-1}$) a um certo volume da solução defecada (entre 10 e 20 mL) para determinação da lactose, perfazendo a 100 mL com água destilada. Levou-se à ebulição durante 2 minutos, deixou-se repousar o precipitado e filtrou-se com o líquido ainda quente através dum cadinho de fundo filtrante, seco e tarado. Lavou-se o copo e o precipitado de óxido cuproso com água aquecida a cerca de 60 °C, secou-se o cadinho em estufa a 103 ± 2 °C durante 2 horas, arrefeceu-se no exsicador e pesou-se, obtendo-se o peso de óxido cuproso por diferença de pesos.

Todas as pesagens foram efectuadas numa balança Mettler Toledo AB204 e todos os reagentes eram de qualidade analítica. Os resultados foram expressos em g L^{-1} de lactose, convertendo o peso de óxido cuproso em equivalentes de lactose a partir da tabela anexa à norma NP 675, e calculando para o volume de amostra utilizado.

5.5. Proteína (azoto total)

A proteína bruta foi determinada por quantificação do azoto total pelo método de Kjeldahl (Watts & Halliwell, 1996) e convertendo este valor em proteína bruta considerando que a totalidade do azoto está na forma proteica.

Sumariamente, mediram-se rigorosamente 25 mL de amostra para um tubo de digestão ao qual se adicionou 10 mL de ácido sulfúrico (95-97%), uma porção de mistura catalisadora composta por selénio e sulfato de potássio, e reguladores de ebulição. A digestão foi efectuada numa placa de aquecimento a 360 °C até a amostra ficar transparente.

A amostra digerida foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL que se aferiu, filtrada para um frasco e reservada para a medição do fósforo para além do azoto.

Num tubo de reacção, colocaram-se então 5 mL da solução anterior, 95 mL de água destilada e 3 gotas de Fenolftaleína. Procedeu-se à alcalinização do meio com uma solução de hidróxido de sódio 6 M, até à viragem do indicador. O tubo foi submetido a uma destilação por arrastamento de vapor num aparelho Kjeltex System 1002 Distilling Unit Tecator, sendo

recolhido o destilado numa solução de 50 mL de ácido bórico (20 g L⁻¹) e 0,5 mL de solução indicadora de ácido bórico (0,2 g de vermelho de metilo em 100 mL de solução alcoólica 95% + 0,1 g de azul de metileno em 50 mL de solução alcoólica 95%). Considerou-se a reacção completa quando o erlenmeyer contendo a solução de ácido bórico atingiu os 200 mL.

O destilado foi titulado com uma solução padronizada de ácido clorídrico (aprox. 0,02 N), sendo os resultados calculados pela fórmula (1) e expressos em mg de azoto por litro.

$$N = \frac{Vt \times 14,01 \times [HCl]}{Va} \quad (mg \text{ L}^{-1}) \quad (1)$$

Sendo Vt o volume de titulante, $[HCl]$ a concentração da solução de ácido clorídrico, e Va o volume de amostra (5/100/25 = 1,25 mL).

A estimação do teor em proteína bruta foi obtida através da multiplicação do valor de azoto total por um factor de conversão baseado na percentagem de azoto na proteína. Neste caso, e apesar do factor geralmente usado para as proteínas do leite ser 6,38 (Bylund, 1995), utilizou-se o factor de 6,25 exigido pelo Regulamento (UE) N. 1169/2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios.

5.6. Fósforo

Para a determinação do fósforo foi utilizada a digestão a quente com H₂SO₄ descrita na secção anterior (Watts & Halliwell, 1996), seguida pela determinação dos fosfatos por espectrofotometria de absorção molecular, através da formação de um complexo corado com uma solução de molibdato de amónio na presença de ácido ascórbico e tartarato de potássio e antimónio (Watanabe & Olsen, 1965).

Resumidamente, foi construída uma recta de calibração de absorvância a 880 nm versus concentração de fósforo (mg L⁻¹), preparando-se diversas soluções de diferentes concentrações de fósforo (0; 0,05; 0,10; 0,20; 0,30 mg P L⁻¹), às quais se adicionou 8 mL de agente redutor (250 mL H₂SO₄ 5 N + 75 mL molibdato de amónio 40 g L⁻¹ + 2,6 g ácido ascórbico + 25 mL tartarato de potássio e antimónio 2,8 g L⁻¹, em 500 mL), tendo-se aferido a 100 mL. A medição da absorvância destas soluções foi efectuada após 20 minutos.

Para a determinação do fósforo na amostra, a solução reservada (ver secção anterior) foi diluída de 1:50 (diluição necessária para um valor de absorvância dentro dos valores da recta de calibração efectuada) e a 2 mL desta adicionou-se uma gota de fenolftaleína e alcalinizou-se com hidróxido de sódio 6 N até mudança do indicador. De seguida juntaram-se 8 mL de agente redutor, aferiu-se a 100 mL e efectuou-se a leitura da absorvância após 20 minutos.

A medição para a amostra foi feita em duplicado e foi utilizado um espectrofotómetro Shimadzu UV-120-11 para todas as observações.

Os resultados foram expressos em mg P L⁻¹, obtendo-se a concentração da amostra por interpolação da recta de calibração e considerando as diluições efectuadas.

5.7. Cloretos

A determinação de cloretos foi efectuada pelo método de titulação volumétrica com nitrato de prata (AOAC, 1990), efectuando uma neutralização prévia da amostra com fenolftaleína e hidróxido de sódio.

10 mL de amostra neutralizada foram titulados com AgNO_3 na presença de KCrO_4 até viragem do indicador. O ensaio foi efectuado em duplicado e foi efectuado um branco. Os resultados foram expressos em $\text{g Cl}^- \text{L}^{-1}$.

5.8. Elementos minerais

A cinza obtida como descrito em 5.2 foi utilizada para a determinação dos vários minerais pelo método de absorção atómica descrito por Vandecasteele e Block (1993). A cinza foi digerida com 10 mL de HNO_3 1:1 em banho-maria a 95 °C durante 20 minutos, filtrada para um balão de 100 mL, que se aferiu. Efectuaram-se duas diluições (1:20 e 1:400) para permitir a medição dos elementos presentes nas amostras em maior concentração.

Foram então determinadas as concentrações de Sódio, Potássio, Cálcio, Magnésio, Ferro, Manganês, Zinco, Cobre, Crómio, Cádmio, Chumbo e Níquel num espectrofotómetro de absorção atómica Thermo Electro Corporation MSeries e os resultados foram expressos em mg L^{-1} .

6. Avaliação da estabilidade do soro pasteurizado

6.1. pH, acidez e °Brix

O pH e a acidez foram determinados pelos métodos já descritos em 5.1.

Para a determinação do °Brix usou-se um refractómetro Hanna Instruments HI 96801.

6.2. Análises microbiológicas

A análise foi conduzida em ambiente estéril numa câmara de fluxo laminar Steril-Helios e foram utilizadas estufas Memmet para incubação das placas. A preparação das amostras foi efectuada de acordo com a NP 1829:1982, tendo-se utilizado aparelhos e utensílios de material inerte, limpo e esterilizado. De acordo com a NP 1829, a preparação das amostras foi efectuada de modo a conduzir a uma perfeita uniformidade da distribuição dos microrganismos e com os indispensáveis cuidados de assepsia de modo a evitar qualquer contaminação. Foram preparadas uma série de diluições decimais de acordo com a ISO 6887-1:1999. A contagem de microrganismos foi realizada seguindo a ISO 8199:2005.

A contagem de microrganismos totais viáveis (MTV) foi efectuada incorporando 1 mL da amostra ou suas diluições em meio PCA (*Plate Count Agar*) que se incubou a 30 ± 1 °C durante 72 horas (ISO 4833-1:2013).

Para a contagem de bolores e leveduras (B&L) pipetaram-se 0,2 ml da amostra ou suas diluições, para placas de Petri contendo o meio de cultura *Rose Bengal Chloramphenicol Agar* (RBC), e espalhou-se o inóculo com o auxílio de um semeador. As placas para a contagem de bolores e leveduras foram incubadas a 25 ± 1 °C durante 5 dias (ISO 6611:2004; IDF 94:2004).

A análise de *Lactobacillus* e *Streptococcus* foi realizada de acordo com a norma ISO 7889:2003 (IDF 117:2003), ignorando o passo de preparação da diluição primária, dado se tratar de uma amostra de soro e não de iogurte. As diluições decimais foram preparadas como descrito acima.

Para determinação de *L. bulgaricus* incorporou-se 1 mL da amostra ou suas diluições em meio MRS (*Man Rogosa Sharpe Agar*) e incubou-se numa caixa de anaerobiose a 37 ± 1 °C por 72 horas. No caso do *S. thermophilus*, a amostra foi incorporada em meio M17 Agar e incubada a 37 ± 1 °C por 48 horas (em aerobiose).

O cálculo das UFC foi efectuado através da equação (2) e expresso em UFC mL⁻¹.

$$N = \frac{C}{n_1 + 0,1n_2 d} \quad (2)$$

Sendo ΣC somatório de colónias contadas nas placas de Petri com um número de colónias contável; n_1 número de placas de Petri correspondentes à primeira diluição com um número de colónias contável; n_2 o número de placas de Petri correspondentes à segunda diluição com um número de colónias contável; d o factor de diluição correspondente à primeira diluição contável.

6.3. Azoto amoniacal, solúvel e não proteico

Os teores de azoto amoniacal, solúvel em água e não proteico foram determinados usando os métodos descritos por Soares (2013) e Silva (2000), modificados para uma amostra em fase líquida. Foram utilizados um aparelho de arrastamento de vapor Kjeltex System 1002 Distilling Unit Tecator e reagentes de qualidade analítica.

Para a determinação do azoto amoniacal, tomas de 10 mL de amostra foram neutralizadas e alcalinizadas com uma solução de hidróxido de sódio 6 M e submetidas a arrastamento de vapor, sendo o destilado recolhido e titulado como descrito na secção 2.5 deste capítulo.

O azoto solúvel em água (daqui em diante referido como azoto solúvel) foi obtido filtrando a amostra (papel de filtro Whatman n.º 40) e submetendo 5 mL do filtrado à técnica de Kjeldahl descrita em 5.5 (Kuchroo & Fox, 1982).

Já o teor de ANP foi determinado por adição de TCA a 12% de concentração final a porções de 10 mL de amostra filtrada, sendo a mistura agitada e mantida em repouso no frio durante 24 h para precipitação selectiva dos componentes azotados. A mistura foi então filtrada e alíquotas de 10 mL a 15 mL foram analisadas pelo método de Kjeldahl já descrito.

Os resultados foram expressos em teor de azoto (amoniacal/solúvel/ANP) por unidade de azoto total (m/m).

7. Avaliação das propriedades funcionais

7.1. Estabilidade da espuma

A capacidade de formação de espumas (FE), a capacidade de expansão da espuma (ExE) e a estabilidade da espuma formada (EE) foram determinadas de acordo com o método descrito por Horax *et al.* (2011). Assim, adicionaram-se 200 mL de soro num copo de mistura e agitou-se por meio de varinha-mágica durante 15 segundos. Registou-se volume de espuma imediatamente após a finalização da agitação, bem como o volume total (líquido mais espuma) após finalização da agitação.

O volume de espuma foi então registado após 15 minutos (tempo arbitrário) após a finalização da agitação, bem como o volume total (líquido mais espuma) após 15 minutos. O ensaio foi realizado em triplicado.

A capacidade de formação de espumas (FE, em %) foi calculada de acordo com a equação 3, que se segue (Horax *et al.* (2011), modificado):

$$\%FE = V_0/V_{Li} \times 100 \quad (3)$$

Onde, V_0 representa o volume de espuma imediatamente após a finalização da agitação (em mL) e V_{Li} representa o volume inicial de soro (em mL).

A capacidade de expansão da espuma (ExE, em %) foi calculada de acordo com a equação 4 (Wang & Wang, 2009):

$$\%ExE = (V_{T0} - V_{Li})/V_{Li} \times 100 \quad (4)$$

Onde, V_{T0} representa o volume total (líquido mais espuma) imediatamente após a finalização da agitação (em mL) e V_{Li} representa o volume inicial de soro (em mL).

A estabilidade da espuma formada (EE, em %) foi calculada de acordo com a equação 5 (Wang & Wang, 2009):

$$\%EE = V_t/V_0 \times 100 \quad (5)$$

Onde, V_0 representa o volume de espuma imediatamente após a finalização da agitação (em mL) e V_t representa o volume de espuma registado no tempo arbitrário de 15 minutos (t_{15}).

7.2. Capacidade Emulsionante

A determinação da capacidade emulsionante do soro foi realizada com base em Elias *et al.* (2006), modificado na forma de medição da inversão da emulsão de acordo com Souza (2009).

Assim, 50 mL de amostra foram misturados com 30 mL de óleo alimentar com o auxílio de agitação magnética durante 30 segundos e a condutividade da emulsão foi medida com um aparelho Mettler Toledo MC226. O óleo foi então adicionado em porções de 5 a 20 mL, efectuando-se a medição da condutividade a cada porção de forma a obter uma curva de

condutividade versus volume de óleo. O ponto de inversão da emulsão foi determinado por intercepção da 2ª derivada da curva obtida com o eixo das abcissas.

A capacidade emulsionante foi calculada como a massa de óleo (g) adicionada até alcançar o ponto de inversão da emulsão, por grama de proteína, utilizando para tal uma densidade de óleo genérica de $0,92 \text{ g mL}^{-1}$ e os valores de teor da proteína encontrados na caracterização do soro. Os resultados foram expressos em gramas de óleo por miligrama de proteína.

8. Tratamento de dados

Os resultados foram expressos na forma de média e desvio padrão para cada amostra. A análise estatística foi feita utilizando o programa Excel através duma análise de variância para um grau de confiança de 95%. Quando considerado necessário, foi feito um teste Tukey às diferenças significativas.

Capítulo III. Resultados e Discussão

1. Caracterização do soro

Os valores de pH, acidez e condutividade obtidos para os diversos tipos de amostra de soro de iogurte diferiram conforme o tratamento, como se pode ver na Tabela III.1.

Tabela III.1 - Resultados de condutividade e pH dos diferentes tipos de amostra

	SP	P63	P72 gordo	P72 magro
pH	4,26 ± 0,01	4,24 ± 0,02	4,17 ± 0,04	4,07 ± 0,14
Acidez (g ác. láctico L ⁻¹)	6,57 ± 0,09	6,83 ± 0,62	6,93 ± 0,09	7,47 ± 0,09
Condutividade (mS cm ⁻¹)	6,47 ± 0,18 d	11,14 ± 0,2 a	9,88 ± 0,17 b	9,74 ± 0,01 c

Letras diferentes na mesma linha assinalam resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$)

O pH apresentou uma tendência de diminuição conforme a temperatura de pasteurização, se bem que estatisticamente não significativa. Isto poderá dever-se à produção de algum ácido láctico pelas LAB no início da pasteurização, dado que o *L. bulgaricus* sobrevive por alguns minutos a 63-67 °C (Teixeira, *et al.*, 1994), o que é corroborado pelos valores obtidos de acidez, que aumentaram com a temperatura de pasteurização (diferenças também não significativas). No que respeita aos valores das amostras de soro de leite magro, há que exercer cautela na comparação de resultados, já que se tratam de amostras provenientes de dois processos diferentes de fabrico do iogurte (ver secção 2.1 do Capítulo I) e alterações no processo de fabrico, especificamente nas temperaturas de pré-tratamento, podem alterar as propriedades medidas (Johansen, *et al.*, 2002). Estas diferenças de pré-tratamentos significam que as proteínas do soro de leite gordo sofreram uma desnaturação prévia, ao contrário das do soro de leite magro, com implicações na composição final de cada proteína no soro, como veremos na secção 3 deste capítulo.

Nergiz e Seçkin (1998) obtiveram um soro de iogurte com um pH de 4 e uma acidez de 7,7 g L⁻¹ (em ácido láctico), o que é próximo dos resultados obtidos neste trabalho. Os valores de pH e acidez do soro de iogurte são bastante diferentes do soro de queijo, que apresenta valores próximos de 6,4 e 0,9 respectivamente (Ji & Haque, 2003; Johansen, *et al.*, 2002; Sanmartín, *et al.*, 2012). Esta diferença é devida ao facto da coagulação do queijo não ser efectuada por abaixamento de pH como no iogurte, mas sim por introdução de coagulantes (Bylund, 1995), excepção feita para alguns tipos de queijo que sofrem esse tipo abaixamento de pH (por exemplo o queijo fresco) e cujo soro resultante é classificado como soro ácido (Gallardo-Escamilla, *et al.*, 2005; Panesar, *et al.*, 2007).

Já no que respeita à condutividade, dado se tratar duma medida das espécies iónicas presentes, podemos dizer que o aumento significativo do valor nas amostras pasteurizadas em relação às não pasteurizadas é indicativo de algumas reacções durante o tratamento (por

exemplo reacções de desaminação características de reacções do final da cadeia proteica e outras envolvendo grupos laterais expostos por desnaturação), bem como da maior concentração de lactatos proveniente da produção de ácido láctico pelas LAB. (McSweeney, 2004; Mulvihill & Donovan, 1987)

A análise macromolecular das amostras recolhidas permitiu obter os resultados apresentados na Tabela III.2. Estes valores são consistentes com os valores obtidos por Nergiz e Seçkin (1998) para o soro de iogurte. Verifica-se que os valores são também semelhantes com dados de soro de queijo, por comparação com os dados de Johansen *et al.* (2002), que avaliaram as variações de composição de soro derivadas da sazonalidade, pasto, genótipo, estágio de lactação, clima e processo de fabrico, obtendo os valores apresentados na última coluna da Tabela III.2. Outros autores estudaram soro por tipo de queijo (Gallardo-Escamilla, *et al.*, 2005), tendo encontrado valores aproximadamente dentro dos mesmos parâmetros.

Tabela III.2 - Caracterização do soro de iogurte (P63)

	Soro de leite magro	% ¹	Soro de leite gordo	% ¹	Literatura ²
Matéria Seca (g L ⁻¹)	64,5 ± 0,2		61,8 ± 0,3		64,6 ; 61,3-66,9
Proteínas (g L ⁻¹)	7,1 ± 0,2	11%	5,1 ± 0,4	8%	4,6 ; 4,3-6,6
Lípidos (g L ⁻¹)	4,09 ± 2,24	6%	0,18 ± 0,05	0,3%	0,46 ; 0,4-3,5
Açúcares (g L ⁻¹) ³	44,8 ± 2,3 ⁴	70%	48,4 ± 0,3 ⁴	78%	51 ; 45,4-51,9
Cinza (g L ⁻¹)	8,44 ± 0,01	13%	8,09 ± 0,02	13%	7,7 ; 4,9-5,7

¹ Percentagem de sólidos em base seca.

² Valor obtido por Nergiz e Seçkin (1998) para soro de iogurte; seguido de intervalo obtido por Johansen *et al.* (2002) para soro de queijo de diversas proveniências e em diferentes alturas do ano.

³ Valores calculados por diferença de cinza, lípidos e proteína em relação à matéria seca.

⁴ Erro calculado por propagação do desvio padrão associado às restantes medições efectuadas.

Mais uma vez é de salientar que, apesar do leite gordo e magro utilizados na produção de iogurte terem sido obtidos do mesmo produtor, existem factores que influenciam a sua composição. Especificamente, as amostras referidas na Tabela III.2 foram recolhidas com um mês de intervalo, o leite magro terá sofrido um tratamento adicional de remoção de gordura, e o pré-tratamento à produção de iogurte é também diferente. Comparações entre os soros de leite gordo e magro serão, portanto, feitas à luz destas diferenças.

1.1. Lípidos

O baixo teor de lípidos encontrado é consistente com o facto da maioria da gordura ficar retida no coágulo, tal como observado por Nergiz e Seçkin (1998) para a produção de iogurte do tipo Torba (iogurte tradicional turco, produzido pelo mesmo método de produção do iogurte grego). De facto, a gordura existe no leite na forma de glóbulos estabilizados por uma camada de proteínas, lipoproteínas e fosfolípidos. Estes glóbulos são as partículas de maior tamanho, e também de menor densidade, que existem no leite, pelo que têm tendência a permanecer no coágulo e de não passarem pelo filtro de dessoramento. (Bylund, 1995; Tamime, *et al.*, 1995)

A técnica utilizada para a medição do teor de lípidos não deu resultados consistentes em todos os ensaios, e em particular no caso do soro de leite magro, embora se tivesse repetido a análise diversas vezes para se poder obter resultados mais fiáveis e concordantes. Para todos os ensaios o teor encontrado para o soro de leite magro foi superior ao do encontrado para o soro de leite gordo, sugerindo que, apesar do menor conteúdo inicial de gordura, o tipo de gordura restante no leite após desnatação terá menor capacidade para formar ligações com a caseína, e assim ficar retida no coágulo (Tamime, *et al.*, 1995). Efectivamente, Jaros *et al.* (2001) observaram que a composição da gordura do leite, mais especificamente os tipos de ácidos gordos envolvidos, têm influência na reologia dos respectivos coágulos, e Michalski *et al.* (2002) concluíram que o tamanho dos glóbulos de gordura tem influência na estrutura de ligações formadas. Não foi possível encontrar dados de composição de soro de iogurte magro na literatura para comparar os resultados obtidos.

Os resultados confirmam a percepção inicial que a lipólise e lipoxidação não serão importantes para prever o tempo de prateleira do soro, dado o baixo teor de lípidos.

1.2. Açúcares

Os valores de açúcares apresentados na Tabela III.2 foram calculados por diferença de cinza, lípidos e proteína em relação à matéria seca (daqui em diante referido como método das diferenças). O teor de lactose pelo método de Munson-Walker foi determinado apenas para o soro de leite gordo tendo-se obtido uma média de 47,6 g L⁻¹ nas amostras analisadas, sem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre soro pasteurizado (P63) e sem pasteurização. Podemos então assumir que todo o açúcar presente consiste em lactose, ou os seus monómeros galactose e glucose (este último vestigial), que não são completamente consumidos pelas LAB no processo de fermentação da produção de iogurte (o *S. thermophilus* e o *L. bulgaricus* só metabolizam a glucose sendo a galactose excretada para o meio (Panesar, *et al.*, 2007)).

Zall (1992) nota que o soro ácido deverá ter um teor de açúcares inferior ao do soro de queijo devido à conversão da lactose em ácido láctico por acção das LAB. No entanto, a maioria dos valores encontrados na literatura, quer para o soro ácido derivado da produção de caseína (Bylund, 1995), quer para o soro de iogurte (Nergiz & Seçkin, 1998), estão próximos dos valores obtidos. A maioria dos autores que estudaram o soro de leite utilizaram o método das diferenças nas suas determinações, pelo que se preferiu considerar, para comparação, este método.

1.3. Proteína e azoto

Como já foi referido, a proteína total foi calculada através da multiplicação do valor de azoto total pelo factor de conversão 6,25 exigido pelo Regulamento (UE) N. 1169/2011. O factor que é usualmente aplicado às proteínas do leite é 6,38 (Bylund, 1995), mas a diferença da utilização de um ou outro factor é inferior ao desvio padrão do resultado.

O soro de leite magro apresentou um teor de proteína superior ao do soro de leite gordo. Isto poderá ser devido aos diferentes pré-tratamentos aplicados ao leite na produção de iogurte que alteram a estrutura das proteínas do soro, tornando-as mais ou menos propícias a formarem ligações com a caseína e assim ficarem retidas no coágulo. (Bylund, 1995; Tamime, 2006)

Para além do azoto total, foram calculadas as fracções de azoto associadas à proteólise apresentadas na Tabela III.3. Observou-se um claro aumento do azoto amoniacal com o aumento da temperatura de tratamento, o que é indicativo de alguma libertação de espécies azotadas das proteínas. De facto, a α -La e a BSA começam a desnaturar a 62 e 64 °C (pH 6), respectivamente, e quando se dá o desdobramento dum cadeia proteica pode haver reacções entre terminais da cadeia. (De Wit & Klarenbeek, 1984; Patel, *et al.*, 2015)

Tabela III.3 - Resultados das fracções de azoto amoniacal, solúvel e não proteico para cada tratamento

Pasteurização (Soro de leite gordo)	Azoto amoniacal / Azoto Total	Azoto solúvel / Azoto Total	Azoto não proteico (ANP) / Azoto Total
SP	0,088 ± 0,002 c	0,838 ± 0,042 a	0,335 ± 0,010 b
P63	0,150 ± 0,002 b	0,733 ± 0,036 b	0,333 ± 0,009 b
P72	0,170 ± 0,001 a	0,577 ± 0,027 c	0,492 ± 0,025 a

Letras diferentes na mesma coluna assinalam resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Notou-se também uma diminuição do azoto solúvel com o aumento da temperatura de tratamento. Neste caso, a desnaturação (reversível ou irreversível) causada pelo tratamento térmico expõe grupos hidrofóbicos, e diminui a solubilidade individual das proteínas bem como a sua capacidade para formar agregados com as outras moléculas em solução (De Wit & Klarenbeek, 1984). De facto, foi possível observar a formação dum precipitado branco durante o tratamento, que é contabilizado na determinação do azoto total, mas não quando o método de Kjeldahl é aplicado à amostra filtrada (azoto solúvel e ANP).

Só se verificou o aumento significativo ($p < 0,05$) do ANP (diminuição do azoto proteico por desnaturação) para a P72, o que é consistente com a β -Lg e a Ig só começarem a desnaturar a 78 e 72 °C (pH 6), respectivamente. Segundo De Wit e Klarenbeek (1984), no que respeita à solubilidade das proteínas do soro entre 60 e 100 °C, é importante considerar que a desnaturação das proteínas processa-se em dois passos: um primeiro desdobramento da cadeia, que pode ser reversível ou irreversível, e um segundo passo de agregação das moléculas em que pode ocorrer a precipitação desse agregado. Assim, ao aquecer a 63 °C, a α -La começa a desnaturar, mas a desnaturação da α -La é altamente reversível (> 90%), pelo que a proteína volta à sua forma globular com o subsequente abaixamento de temperatura. Dado que o controlo de temperatura não permitia garantir uma temperatura inferior a 64 °C, é de esperar também alguma desnaturação da BSA. Esta última é irreversível, mas como a quantidade de BSA é de apenas cerca de 6% das proteínas do soro (Patel, *et al.*, 2015) e parte poderá ter ficado retida no iogurte (como veremos na secção 3.1 deste capítulo), não se registou essa diminuição de azoto proteico (aumento de ANP) na P63.

A 72 °C começa a desnaturar a Ig (também cerca de 6% das proteínas do soro) e já deverá ter desnaturado irreversivelmente toda a BSA. O aumento do ANP registado nesta série de amostras é consistente com a desnaturação irreversível destas duas proteínas.

1.4. Cinza e minerais

O teor de cinza encontrado é semelhante a valores encontrados na literatura para soro de iogurte (Nergiz & Seçkin, 1998). Os teores de cinza do soro ácido são geralmente superiores aos do soro de queijo, devido ao abaixamento do pH para valores em que os sais de cálcio são mais

solúveis (Zall, 1992). O cálcio e o magnésio encontram-se no soro principalmente associados a citratos, cloretos e fosfatos inorgânicos (Chandan & Kilara, 2013)

Os resultados da análise das espécies minerais presentes no soro são apresentados na Tabela III.4. Os valores de sódio, potássio, cálcio e fósforo são consistentes com Nergiz e Seçkin (1998) para soro de iogurte Torba, mas apresentam cerca de o dobro do fósforo, cálcio e magnésio relatados por Johansen *et al.* (2002) referentes a soro de queijo. Esta diferença será provavelmente devido ao processo de produção com abaixamento de pH, diferença também reportada por Bylund (1995) entre soro de queijo e soro ácido derivado da produção de caseína por abaixamento químico de pH.

Não foi possível encontrar na literatura valores para soro de iogurte de leite magro, pelo que não é possível corroborar as diferenças encontradas entre os dois tipos de soro, em especial o valor significativamente maior do teor de cloretos, que não é acompanhado pela igual diferenciação do teor de sódio, pelo que não pode ser atribuído à variação natural do leite segundo a fase de lactação. Para além dos cloretos, as maiores diferenças notaram-se no fósforo, cálcio e ferro, que podem estar associadas à presença ou ausência de gordura no leite, no momento da formação do coágulo. Os glóbulos de gordura que se formam no leite são estabilizados por uma membrana que inclui as micelas de caseína e outras proteínas (para além de fosfolípidos, lipoproteínas, glicéridos, enzimas e outros, com constantes trocas com o meio), que se ligam à gordura através das suas partes hidrofóbicas (Bylund, 1995). Na ausência dos glóbulos de gordura, estes centros hidrofóbicos da caseína ficam livres para formarem ligações ao cálcio, que por sua vez forma iões complexos com ortofosfatos e citratos (Gaucheron, 2005). Com o abaixamento do pH, os complexos de ortofosfato e cálcio ficam ligados às micelas da caseína, fazendo inclusive ligação a outras proteínas presentes, o que explica teores de cálcio e fósforo inferiores no soro de iogurte magro. (Hernández & Harte, 2009)

Tabela III.4 - Resultados da análise da cinza do soro

	Soro de leite magro	Soro de leite gordo
Fósforo (g L ⁻¹)	1,0 ± 0,2	2,0 ± 0,5
Cloretos (g L ⁻¹)	2,89 ± 0,05	0,62 ± 0,01
Sódio (g L ⁻¹)	0,43 ± 0,04	0,42 ± 0,02
Potássio (g L ⁻¹)	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Cálcio (g L ⁻¹)	1,05 ± 0,06	1,77 ± 0,02
Magnésio (g L ⁻¹)	0,19 ± 0,01	0,16 ± 0,01
Ferro (mg L ⁻¹)	5,2 ± 1,5	0,39 ± 0,01
Zinco (mg L ⁻¹)	2,86 ± 0,01	3,21 ± 0,09
Cobre (mg L ⁻¹)	<0,041	0,24 ± 0,08
Manganês (mg L ⁻¹)	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,02
Crómio (mg L ⁻¹)	0,7 ± 0,2	<0,05

Outro factor que poderá ter influência na composição da cinza é o facto de serem aplicados diferentes pré-tratamentos ao leite para o fabrico dos iogurtes. Como vimos na secção 2.1 do

Capítulo I, a temperatura de pré-tratamento do leite gordo é de 68-70 °C, ao passo que a do leite magro é de 55-57 °C. Assim, no soro de leite gordo, a α -La é desnaturada e no soro do leite magro não é. Apesar de esta desnaturação ser reversível, as alterações conformacionais podem implicar a quebra da ligação desta proteína ao cálcio (Gaucheron, 2005), aumentando a sua presença no soro de iogurte gordo e formando os complexos de ortofosfato de cálcio já descritos (Hernández & Harte, 2009).

Quanto ao ferro, de acordo com o Instituto Dr. Ricardo Jorge (INSA, 2015) o leite gordo tem cerca de 1 mg de ferro por litro, e o leite magro tem cerca do dobro. A maior parte do ferro encontra-se ligado à caseína, e mantém essa ligação quando a caseína coagula (pH < 4,5). No entanto, cerca de 10% do ferro existe na forma iónica ou ligado a proteínas do soro (BSA, lactoferrina, catalase, peroxidase, entre outras). (Hekmat & McMahon, 1998). Este ferro existente no soro, dado que o soro é escoado até 50% do volume de leite inicial, fica mais concentrado no soro de leite magro do que no soro de leite gordo. A maior concentração de ferro no soro de leite magro também se pode dever ao facto do ferro ficar complexado na interface dos glóbulos de gordura (Hekmat & McMahon, 1998), que no caso do leite magro não ficaram totalmente retidos no coágulo. No entanto, esta hipótese não foi explorada.

Para além dos elementos mais comuns estudados, foi também analisada a presença de outros microelementos, sendo apresentados na Tabela III.4 os resultados obtidos. Para além destes, foram analisados o cádmio, o chumbo e o níquel que apresentaram resultados inferiores ou no limiar do limite de detecção (0,032, 0,10 e 0,063 mg L⁻¹ respectivamente).

A composição da cinza do soro de iogurte será uma das principais diferenças em relação ao soro de queijo que é mais largamente estudado na literatura. Para além dum teor mais elevado de cinza, a sua composição é diferente e contém mais cálcio e fósforo que têm influência nas propriedades funcionais do soro, como veremos na secção 3 deste Capítulo. (Bylund, 1995; Zall, 1992)

2. Avaliação da estabilidade do soro pasteurizado

2.1. pH, acidez e °Brix

Nas amostras das séries P63/20°C e SP/4°C, os valores de pH oscilaram ao longo do período de estudo (Figura III.1) apresentando um mínimo aos 13 dias de armazenagem. Nas amostras das séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C (Figura III.2), o pH apresentou-se sem alteração significativa ($p > 0,05$) ao longo dos 90 dias do estudo, variando sem tendências entre 4,07 e 4,29.

Nogueira *et al.* (1998) também observaram um abaixamento de pH da 3ª para a 4ª semana em iogurtes, indicando que a actividade das LAB, apesar de minimizada a 4 °C, pode ser um factor a considerar. De notar, no entanto, que as amostras P63 não apresentaram desenvolvimento microbiológico na sua maioria (como veremos na secção seguinte), o que é coerente com a redução do pH ao 13º dia obtida não ser significativa.

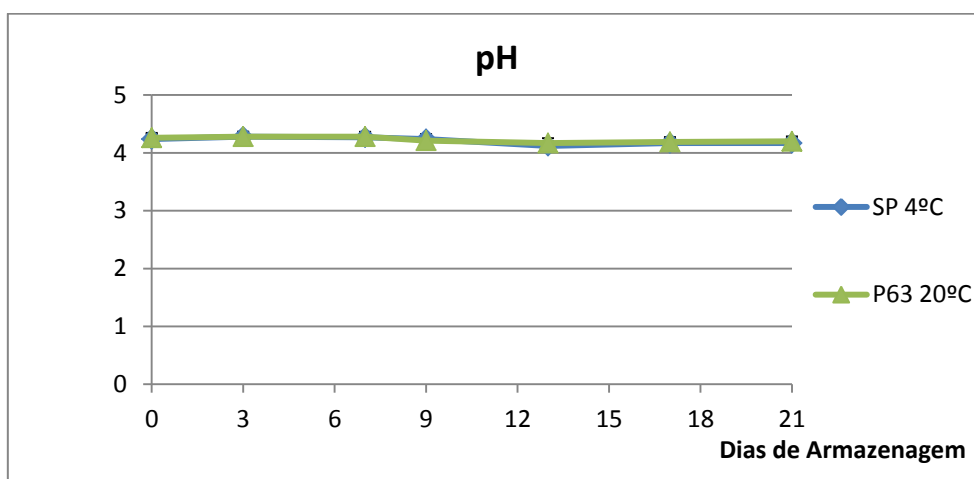


Figura III.1 - Resultados de pH para as séries P63/20°C e SP/4°C

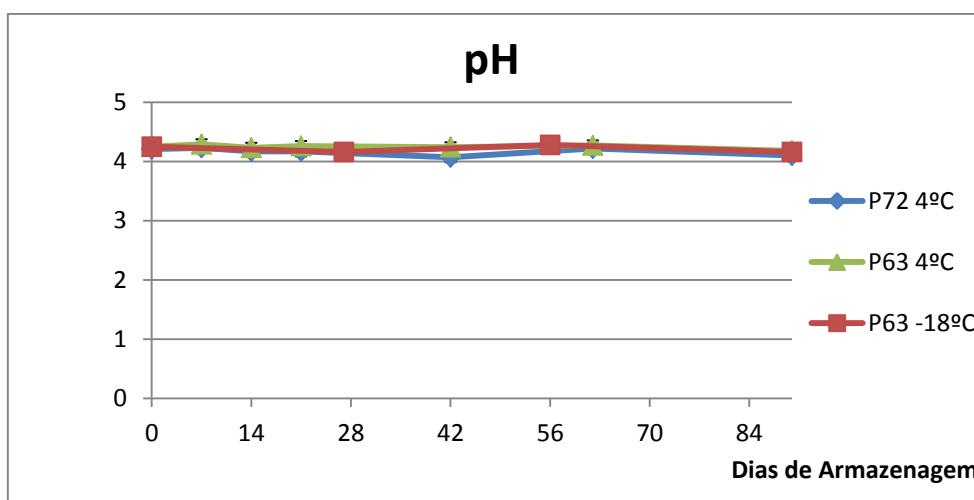


Figura III.2 - Resultados de pH para as séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C

As variações da acidez mostraram ser não significativas ($p > 0,05$) para todas as séries ao longo dos 90 dias (Figura III.3 e III.4), o que corrobora a não variação observada para o pH. Os valores flutuaram sem tendência entre 6,48 e 8,55 g de ácido láctico por litro, compatível com os valores recomendados para o iogurte, entre 6 e 14 g L⁻¹ (Chandan & Kilara, 2013; Tamime, 2006).

Os valores de pH obtidos são inibidores de grande parte do crescimento microbiano. Por exemplo, a *Acinetobacter* spp. e o *Bacillus subtilis* são bactérias conhecidas por causar deterioração em produtos lácteos, mas ambos necessitam de pH acima de 4,2 para se multiplicarem. Entre os patogênicos que conseguem crescer a estes pH e que podem ser encontrados nos laticínios encontram-se a *Escherichia coli* O157:H7 e a *Salmonella* spp.. Estas bactérias podem multiplicar-se a pH acima de 4,0 mas possuem uma temperatura mínima de crescimento de 15 e 7 °C respectivamente, pelo que podem ser controladas colocando o

alimento a 4 °C. Já a *Listeria monocytogenes*, uma contaminação mais comum na indústria de laticínios, necessita dum pH mínimo de 4,3 para o seu crescimento. (Steele, 2004)

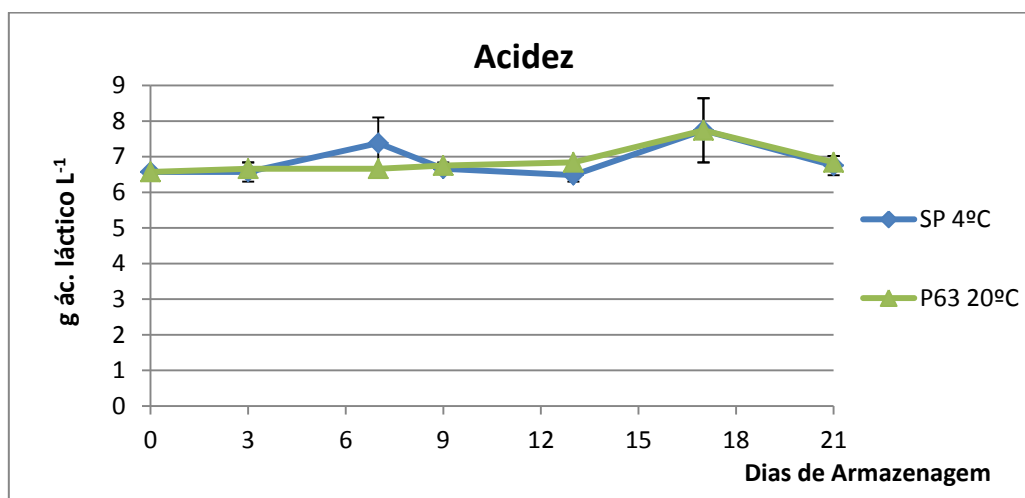


Figura III.3 - Resultados da evolução da acidez para as séries SP/4°C e P63/20°C

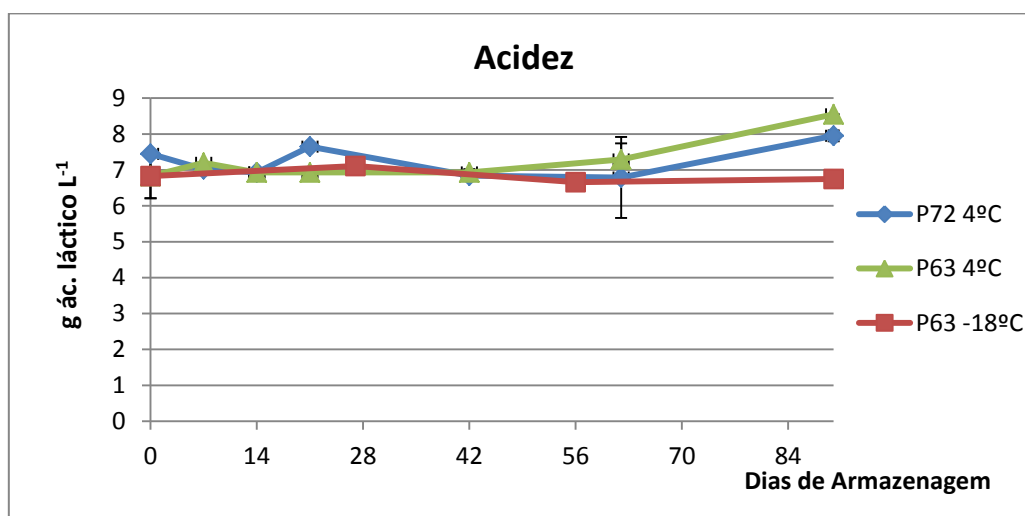


Figura III.4 - Resultados da evolução da acidez para as séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C

Os B&L conseguem crescer a pH mais baixos. As subespécies de *Candida* são agentes de deterioração em laticínios e, como a maioria dos fungos, têm um pH mínimo de crescimento inferior a 2. O valor de pH mínimo da maioria das leveduras situa-se entre 1 e 5. (Steele, 2004) Estes microrganismos não poderão ser controlados por abaixamento de pH sob risco de tornar o produto demasiado ácido para o gosto do consumidor.

No entanto, estabelecer limites de pH para o soro (e para o iogurte que o origina) poderá ser uma forma de controlo de qualidade e segurança alimentar neste produto. Um pH máximo de 4,2 irá prevenir o crescimento da maioria das bactérias, patogénicas ou de deterioração dos alimentos. O limite inferior será determinado pela qualidade sensorial do produto, mas um pH

próximo de 4,0 será um factor adicional de segurança alimentar. A recomendação mantém-se mesmo se se optar por uma pasteurização do soro, dado que o pH baixo limita a sobrevivência de leveduras ao tratamento térmico. (Steele, 2004; Tamime, 2006)

O °Brix foi medido para cada amostra não mostrando qualquer tendência de evolução ao longo dos períodos estudados (Figura III.5 e III.6). As diferenças registadas foram não significativas entre tratamentos ou dias de armazenagem, indicando que a quantidade de sólidos dissolvidos não sofre grandes alterações durante a armazenagem. Não se encontraram observações do °Brix em soro de iogurte na literatura mas os valores iniciais são comparáveis ao valor inicial de soro de queijo ácido, sendo que Branger *et al.* (1999) observaram valores de 6,5 °Brix em soro de queijo cottage.

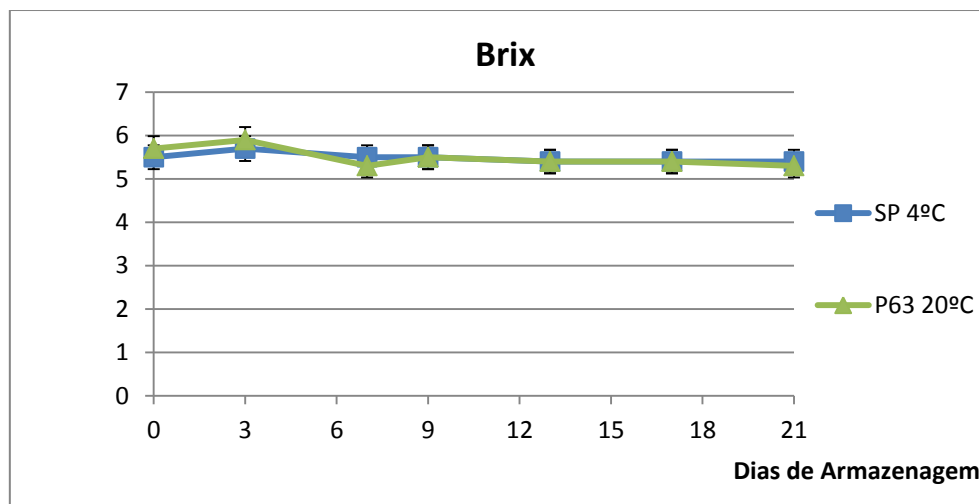


Figura III.5 - Resultados da evolução do °Brix para as séries SP/4°C e P63/20°C

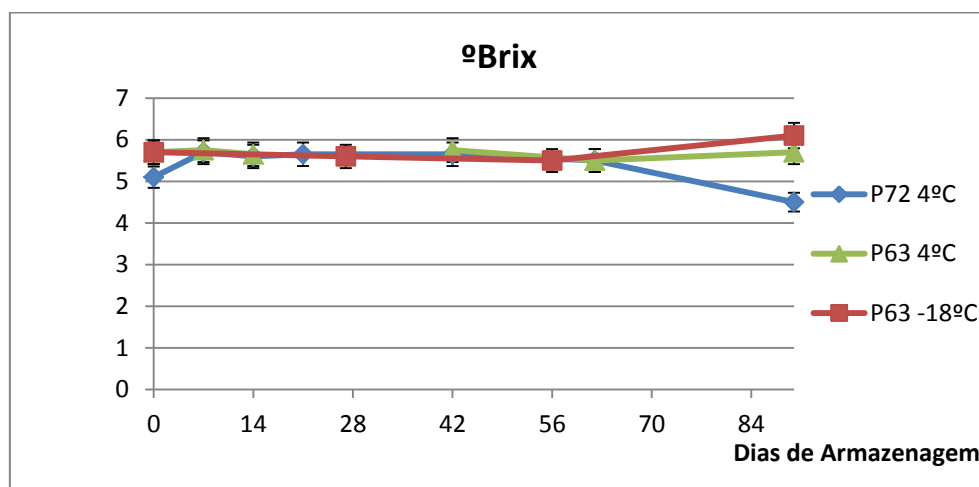


Figura III.6 - Resultados da evolução do °Brix para as séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C

O °Brix é uma medida de sólidos dissolvidos. No caso do soro de iogurte estes sólidos são praticamente toda a matéria seca (lactose, proteínas solúveis, lactatos e sais), o que é concordante com os resultados obtidos. O facto de o °Brix não variar significativamente ao longo dos períodos estudados pode ser indicativo duma estabilidade da lactose (cerca de 70% dos sólidos totais), dada a estabilidade observada na acidez e no azoto solúvel (ver secção 2.3 deste capítulo). De facto, as maiores variações do °Brix observaram-se na série P72/4°C, e acompanham a variação do azoto solúvel para esta série.

Nas indústrias da fruta e sumos, é comum o uso do °Brix como medida de concentração, dado que a maioria dos sólidos dissolvidos são açúcares (Jiao, *et al.*, 2004), mas as aplicações na indústria leiteira não são tão generalizadas. O °Brix pode, por exemplo, ser uma boa medida da qualidade do *colostrum* (leite da fase inicial de lactação das vacas), dado existir uma relação com o teor de Ig presentes (Bielmann, *et al.*, 2010).

No caso do soro, no entanto, uma relação entre o °Brix e acidez titulável, ou °Brix e pH, poderá ter relação com o desempenho sensorial do produto. Os rácios Brix/Acidez e Brix/pH são usados nas indústrias da fruta como indicador da maturidade e paladar das frutas (Yoon, *et al.*, 2006). Como já foi mencionado (secção 2.1 do Capítulo I), um iogurte concentrado não é considerado demasiado ácido a pH 3,8 devido ao seu teor de sólidos totais mais elevado, e o mesmo acontece com a fruta. Jayasena e Cameron (2008) encontraram uma boa relação entre o rácio Brix/Acidez e a aceitação dum painel treinado de provadores em relação a uvas de mesa. Assim, um °Brix elevado pode ser um factor interessante no soro, e a sua relação com a acidez titulável poderá ser testada como indicador da aceitação de bebidas à base de soro. Esta poderá ser uma via de estudo a prosseguir em relação a este produto, mas que não foi explorada neste trabalho.

2.2. Análises microbiológicas

As amostras das séries P63 (Figura III.7) não apresentaram tendência de crescimento de microrganismos (MTV ou B&L) nos 90 dias estudados, em nenhuma das temperaturas de armazenagem (-18, 4 e 20 °C). Três destas amostras, das 18 estudadas, apresentaram algum crescimento ($< 35 \text{ UFC mL}^{-1}$), indicando que a pasteurização não foi eficaz para todas as amostras, ou que houve contaminação durante ou logo após a pasteurização (a pasteurização foi efectuada em frascos não totalmente fechados para evitar fractura por pressão e fechados logo após pasteurização).

A Portaria nº 742/92 estipula para o iogurte valores máximos de 10 UFC cm^{-3} de bolores e 10^2 UFC cm^{-3} de leveduras e podemos considerar que as amostras de soro pasteurizadas a 63 °C satisfizeram estes requisitos nos períodos de armazenagem estudados.

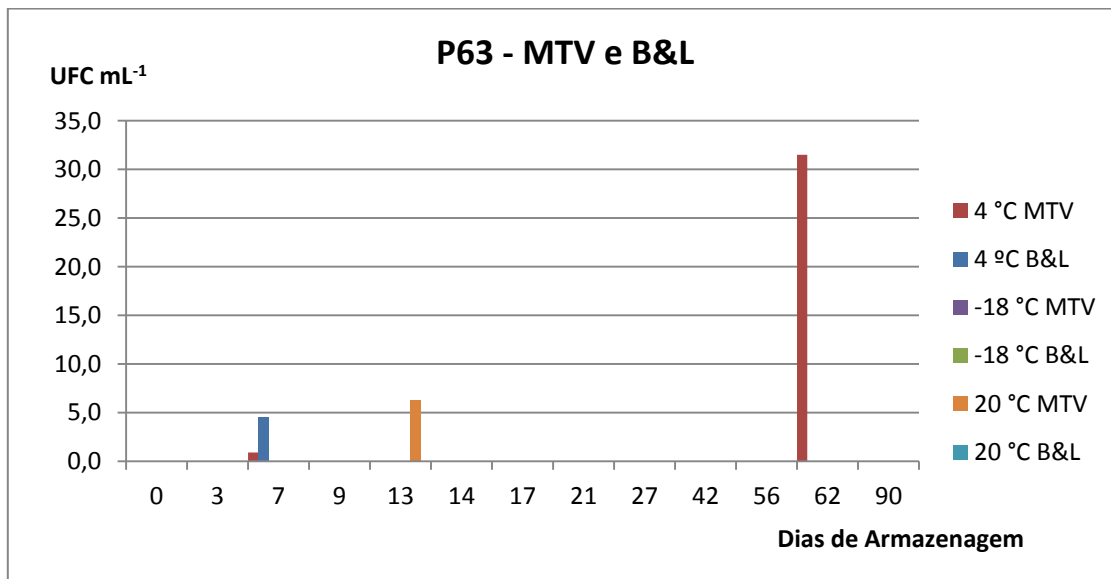


Figura III.7 - Resultados das análises microbiológicas às amostras pasteurizadas a 63 °C

Já as amostras das séries P72 e SP apresentaram crescimento microbiano desde o dia zero, com uma clara tendência de crescimento exponencial dentro dos períodos estudados, como se pode ver pelas Figura III.8 e III.9.

No caso da P72 (Figura III.8), verificou-se um crescimento exponencial nas primeiras 3 semanas, entrando então em fase estacionária a valores superiores a 10^5 UFC mL⁻¹. Uma possível explicação para esta fase estacionária é uma escassez de aminoácidos livres, como veremos na secção seguinte. O tratamento térmico aplicado a estas amostras poderá ter beneficiado o crescimento microbiano no sentido que desnaturou parcialmente as proteínas (como vimos na secção 1.3 deste capítulo). Isto poderá ter permitido que microrganismos sem actividade proteolítica adequada se tenham desenvolvido, mas entrado em fase estacionária quando se esgotou o azoto não proteico gerado na pasteurização (ver também secção seguinte).

A contagem de B&L foi superior à contagem de MTV, indicando que os primeiros são a maior preocupação na estabilização deste substrato. De facto, o pH do soro é limitativo para a maioria das bactérias, mas não para B&L, como foi referido na secção 2 do Capítulo II (Viljoen, 2001). Podemos ainda afirmar que os microrganismos presentes não serão produtores de ácido láctico visto que as amostras não apresentaram redução do pH e a variação de acidez não se correlacionou com o crescimento microbiano. O não aumento das LAB é concordante com observações efectuadas para iogurte, em que a contagem destes microrganismos se mantém sem grandes alterações nos 30 dias do prazo de validade (Nogueira, *et al.*, 1998).

Esta pasteurização não mostrou reduzir a carga microbiana do soro de forma a estender a sua vida útil, como se pode concluir comparando com os resultados obtidos para as amostras SP (Figura III.9), já que os valores ao fim de 21 dias para ambas as séries são muito semelhantes. Se considerarmos os valores impostos para o iogurte na legislação já mencionada, os valores de B&L no soro P72 não são aceitáveis logo a partir da segunda semana.

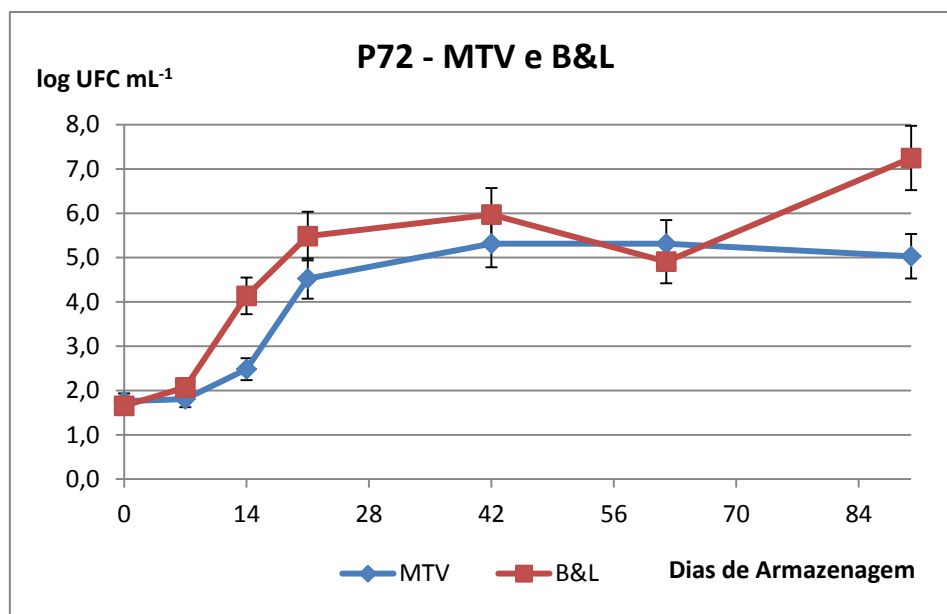


Figura III.8 - Resultados das análises microbiológicas às amostras P72

A maioria das leveduras é inativada em apenas alguns minutos a temperaturas acima de 55 °C, em especial a pH baixos (Steele, 2004). Os resultados indicam que 1 minuto a 72 °C não foi suficiente para aquecer o ponto mais interior do recipiente durante o tempo suficiente para esta inativação, pelo que estas condições de pasteurização devem ser reservadas para uma pasteurização em permutador de calor que permite assegurar que todo o líquido introduzido no permutador atinge a temperatura de 72 °C durante os 15-20 segundos necessários para a inativação de todos os microrganismos (Gao, *et al.*, 2002).

No caso das amostras SP (Figura III.9), os resultados iniciais apresentaram um valor de MTV superior às amostras pasteurizadas, apresentando um decréscimo na primeira semana, mas iniciando então o crescimento exponencial dos B&L até às 3 semanas. Apesar do decréscimo inicial, tal não significa o completo declínio da população de LAB, dado que os B&L e as LAB podem crescer em lacticínios de forma simbiótica, sendo que os B&L podem contribuir para os factores de crescimento das LAB ou *vice-versa*. (Viljoen, 2001)

A amostra SP revelou conter inicialmente 336 UFC mL⁻¹ de *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* e 1,8 UFC/mL de *Streptococcus thermophilus*, indicando que a maioria da flora específica do iogurte fica retida no coágulo, tal como referido por Tamime (2006). De acordo com a Portaria nº 742/92, a flora no iogurte deverá ser no mínimo de 5×10^7 UFC/g (soma de ambas as espécies). Valores de *S. thermophilus* inferiores aos de *L. bulgaricus* foram também encontrados por Nogueira *et al.* (1998) em algumas amostras de iogurte. O baixo valor de *S. thermophilus* poderá ser a razão do declínio inicial dos MTV, dado que sem a actividade peptidolítica destes, o *L. bulgaricus* poderá entrar em declínio por escassez de nutrientes. Este valor inferior de *S. thermophilus* pode ser resultante de uma temperatura de incubação demasiado elevada, dado que temperaturas próximas de 45 °C irão favorecer o *L. bulgaricus*, sendo comum obter-se um rácio final de *cocci* para *bacilli* de 1:2 nestas condições. As consequências duma população de *Streptococci* pouco numerosa são geralmente uma acidez

excessiva, o que não se verificou, e pouco *flavour* no iogurte. (Bylund, 1995; Chandan & Kilara, 2013)

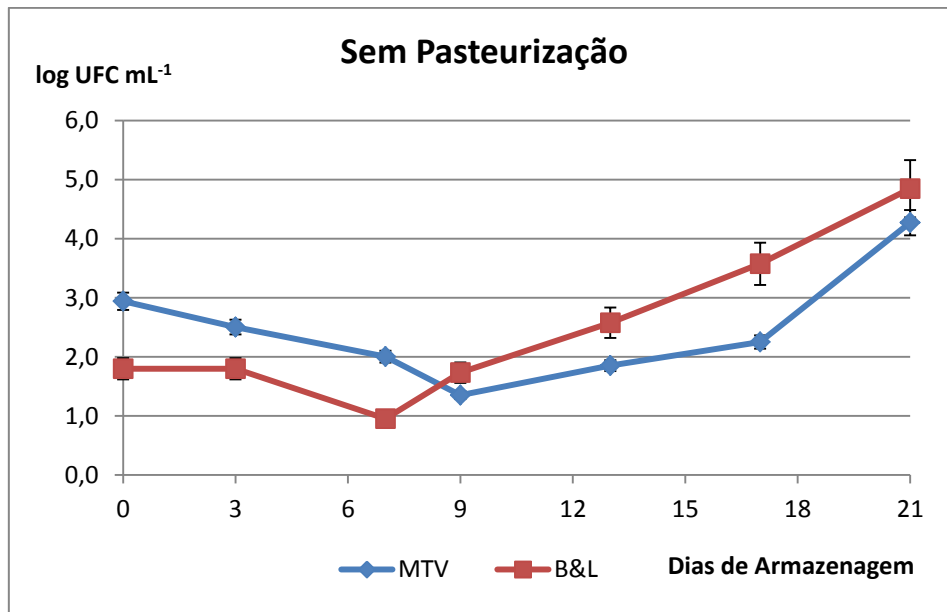


Figura III.9 - Resultados das análises microbiológicas às amostras sem pasteurização

Os resultados encontrados no soro SP encontraram-se acima dos valores estipulados na Portaria nº 742/92 a partir dos 13 dias, pelo que a redução desta carga microbiana é aconselhável para garantir a validade de 3 semanas pretendida. Isto pode ser conseguido por pasteurização ou por redução/eliminação da contaminação pela aplicação do HACCP. A fonte mais provável de contaminação por B&L neste produtor será uma contaminação cruzada proveniente de frutas processadas noutra sala das instalações, e que pode ocorrer através dos operadores, de utensílios e até através do ar (Tamime, 2006).

Outros autores encontraram valores de B&L até $6,8 \times 10^2$ CFU g⁻¹ em iogurtes existentes no mercado português (Nogueira, *et al.*, 1998) e até $2,7 \times 10^3$ CFU g⁻¹ de leveduras em iogurtes disponíveis no Brasil (Moreira, *et al.*, 2001). Vários autores demonstraram também que um bom controlo do desenvolvimento de B&L em queijo de soro pode ser conseguido por embalagem em atmosfera modificada ou vácuo, tendo obtido valores iniciais inferiores a 10^2 UFC g⁻¹ que se mantiveram inferiores a este valor entre 15 a 45 dias, dependendo da atmosfera modificada utilizada (Dermiki, *et al.*, 2008; Papaioannou, *et al.*, 2007). Dermiki *et al.* (2007) usaram uma embalagem de controlo com atmosfera de ar que resultou num crescimento de B&L de cerca de 3×10^3 , 5×10^5 e 1×10^7 UFC g⁻¹ ao fim de 10, 20 e 45 dias respectivamente. Por se tratar dum produto com características diferentes (no estado sólido e produzido com soro proveniente de outra fonte) poderá eventualmente ter condições mais propícias ao crescimento de B&L. No entanto, estes resultados são concordantes com os obtidos no presente trabalho quanto à tendência de crescimento para valores acima dos 10^5 UCF mL⁻¹ ao fim de cerca de 21 dias.

De notar que nem todos os B&L causam deterioração dos alimentos e que só a identificação dos B&L em questão poderá avaliar o risco que representam para a qualidade e segurança do

produto, bem como para o seu tempo de vida útil. Estes B&L, dependendo da espécie, podem causar formação de gás, de compostos tóxicos, turbidez, alterações de viscosidade, de cor, de pH e produção de *off-flavours*, entre outros. (Chandan & Kilara, 2013; Steele, 2004) Apesar de existirem B&L benéficos, a sua eliminação é recomendada. Os iogurtes são bons meios de crescimento para B&L, sendo as espécies de leveduras mais encontradas os *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Trichosporon moniliforme* e *Galactomyces geotrichum*, que são capazes de usar a lactose e possuem actividade proteolítica e lipolítica, e que contribuem para a deterioração mas não são a sua principal causa (Steele, 2004). No caso dos bolores, os géneros mais temidos são os *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Aspergillus* que podem crescer na interface iogurte-ar (Tamime, 2006).

Assim, a redução da carga microbiológica, em especial dos B&L, será fundamental para garantir a qualidade do produto no seu tempo de vida útil. O cumprimento dos limites estabelecidos para o iogurte na Portaria nº 742/92 irá garantir a segurança e qualidade do soro como produto comercial. O tratamento a 72 °C efectuado não se mostrou eficaz para esse fim, e deverá ser descartado. Os resultados microbiológicos obtidos para o soro SP cumprem os requisitos da Portaria nº 742/92 pelo período de 9 dias. A identificação e eliminação da presença de B&L constatada neste trabalho poderá estender o seu tempo de vida útil para 3 semanas ou mais.

Finalmente, a P63 mostrou-se eficaz na eliminação da flora microbiana. No entanto, é necessário implementar um método de pasteurização que ofereça resultados fiáveis. O tempo de vida útil, neste caso, será limitado pela degradação da qualidade do produto não resultante da actividade microbiológica.

2.3. Azoto amoniacal, solúvel e não proteico

Os resultados obtidos para o azoto amoniacal são apresentados nas Figura III.10 e III.11. De notar que os lotes de soro das séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C não são os mesmos que as das séries P63/20°C e SP/4°C, pelo que é considerável a diferença no azoto amoniacal inicial. Esta diferença terá origem em pequenas alterações no processo de produção do iogurte, tais como temperatura de pré-tratamento, tempo de incubação e de dessoramento, e que provocam diferenças no estado de desnaturação ou degradação proteolítica das proteínas (Johansen, *et al.*, 2002).

Não se observaram diferenças significativas entre séries (binómio pasteurização x temperatura de armazenagem). Os valores variaram sem tendência nas primeiras 3 semanas, independentemente da temperatura de armazenagem, seguindo-se um decréscimo até à 6ª semana (T42). Este decréscimo foi verificado inclusive na amostra congelada e de P63, pelo que não pode ser atribuído a actividade microbiana.

O azoto amoniacal presente é resultante de reacções de desaminação características das reacções do final da cadeia proteica ou de aminoácidos livres, e o seu aumento será indicativo de ocorrência de proteólise (Soares, 2013), mas não se verificaram tendências de aumento estatisticamente significativas. O azoto amoniacal inicial dever-se-á em parte à acção microbiana ocorrida no processo de fabrico do iogurte, mas no caso das amostras pasteurizadas também por reacções químicas despoletadas pela pasteurização. A diminuição do azoto amoniacal verificada poderá dever-se a reacções com outras espécies em solução, que capturam o ião amónio impedindo a sua libertação para o meio.

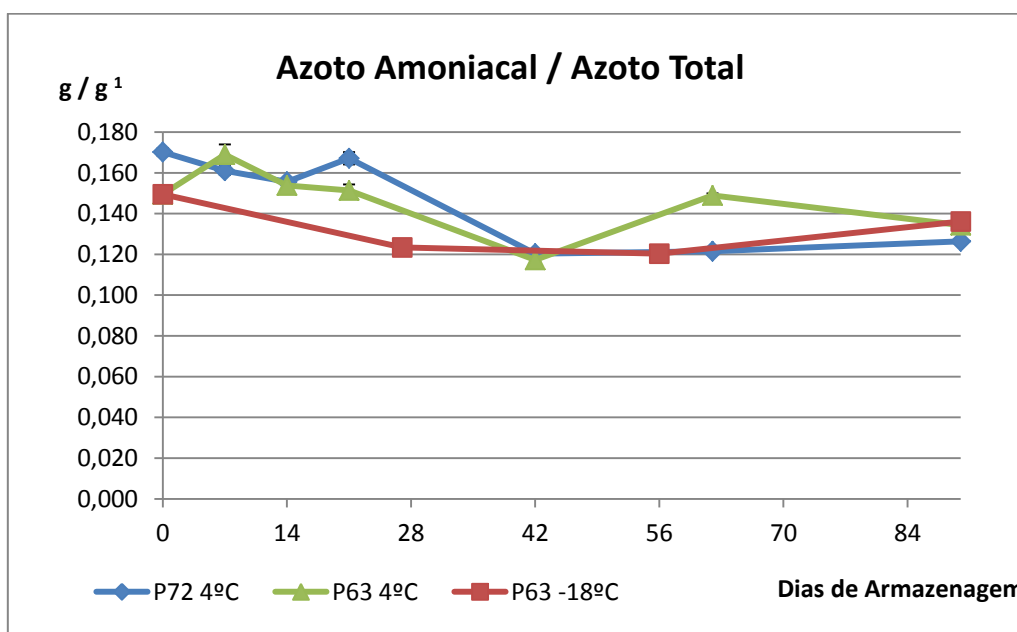


Figura III.10 - Resultados do azoto amoniacal para as séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C

¹ g / g – Rácio entre o teor de azoto amoniacal (g L⁻¹) e o teor de azoto total (g L⁻¹).

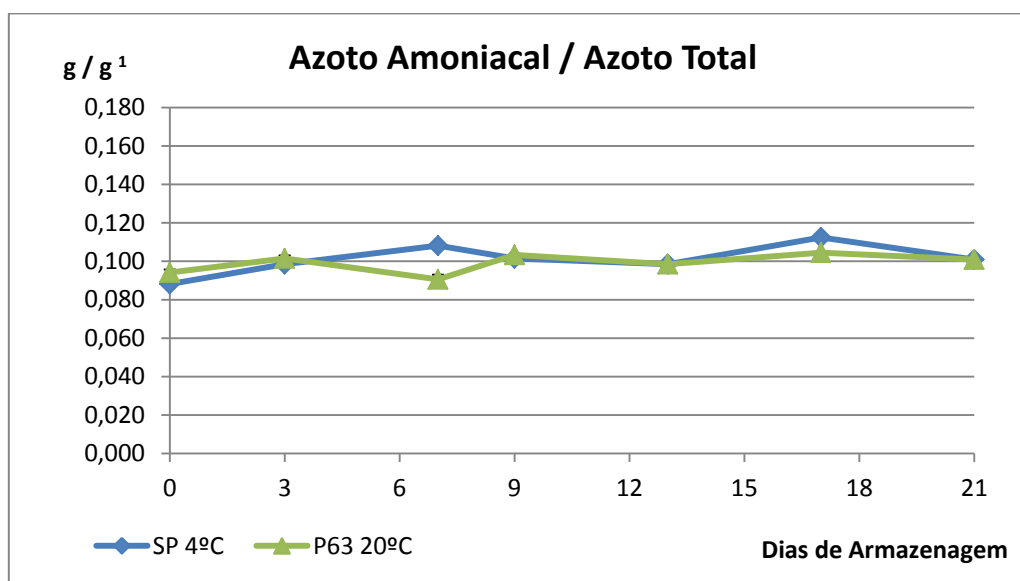


Figura III.11 - Resultados do azoto amoniacal para as séries SP/4°C e P63/20°C

¹ g / g – Rácio entre o teor de azoto amoniacal (g L⁻¹) e o teor de azoto total (g L⁻¹).

A Figura III.12 apresenta a evolução do azoto solúvel para as séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C. As séries apresentaram comportamentos semelhantes, com um aumento significativo ($p < 0,05$) na 1ª semana, seguido duma estabilização em valores entre 83 e 96% de azoto solúvel (diferenças não significativas). No caso da série P72/4°C, a estabilização durou apenas até T62, tendo o valor a T90 sido mais baixo, indicando perda de solubilidade das proteínas.

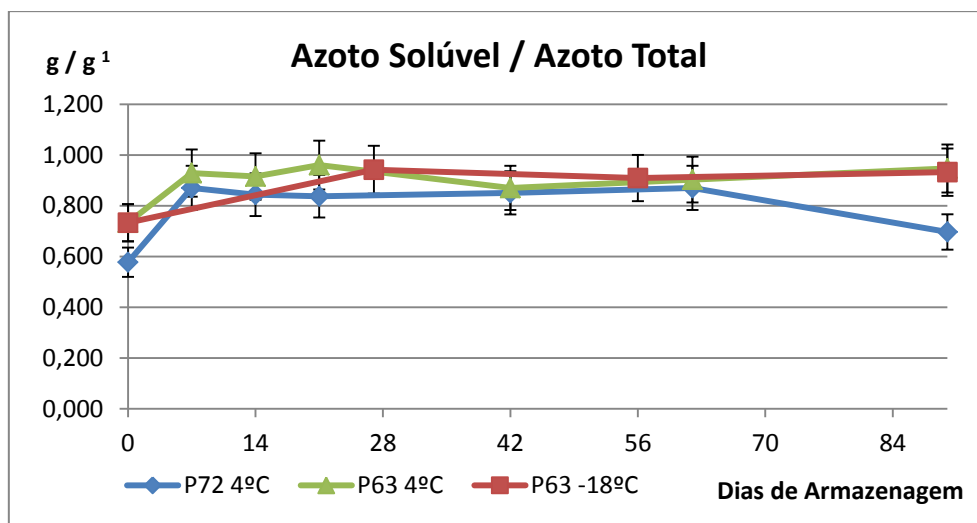


Figura III.12 - Resultados do azoto solúvel para as séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C

¹ g / g – Rácio entre o teor de azoto solúvel (g L⁻¹) e o teor de azoto total (g L⁻¹).

O valor de azoto solúvel é elevado, como esperado, visto que as proteínas do soro são todas solúveis (característica que as torna tão interessantes do ponto de vista funcional). A solubilidade das proteínas está directamente correlacionada com as suas capacidades espumantes e emulsionantes (Foegeding & Davis, 2011). Patel e Kilara (1990) registaram solubilidades entre 91,2 e 98,4 % em concentrados de proteína de soro reconstituídos a pH 7. A solubilidade decresce com a diminuição do pH para valores próximos dos pontos isoeléctricos das proteínas do soro (entre 4,2 e 5,4), o que é concordante com os resultados mais baixos obtidos no presente trabalho. Também a perda de solubilidade devida ao tratamento térmico era esperada e foi observada neste trabalho, tendo os valores das amostras pasteurizadas a 72 °C sido inferiores aos das amostras pasteurizadas a 63 °C, e estes inferiores aos das amostras sem pasteurização. (Schmidt, *et al.*, 1984)

O aumento inicial poderá ser devido à re-conformação das proteínas do soro que tenham sofrido alterações de conformação reversíveis durante a pasteurização e que, após algum tempo a 4 °C, retomam a sua solubilidade (De Wit & Klarenbeek, 1984). Esta particularidade não foi observada nos resultados das séries SP/4°C e P63/20°C (Figura III.13).

As amostras da série SP/4°C mostraram ter uma fracção azoto solúvel superior ($p < 0,05$) às amostras P63/20°C (Figura III.13) e os resultados mostraram-se sem alterações significativas nos dias de armazenagem estudados, à excepção de dois valores anómalos a T9 e T21. Estes valores, apesar de estatisticamente diferentes, não representam uma tendência de evolução do azoto solúvel.

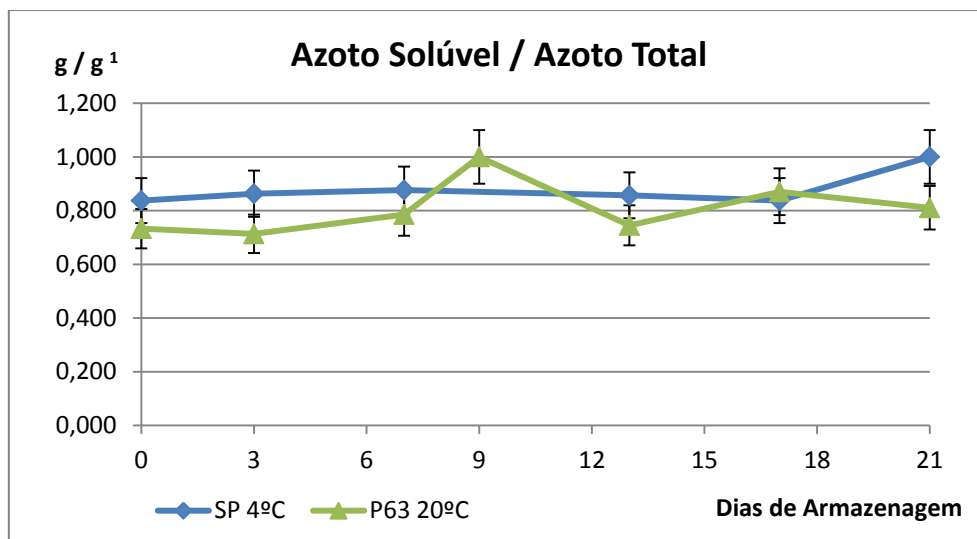


Figura III.13 - Resultados do azoto solúvel para as séries P63/20°C e SP/4°C

¹ g / g – Rácio entre o teor de azoto solúvel (g L^{-1}) e o teor de azoto total (g L^{-1}).

As Figura III.14 e III.15 representam os resultados da fracção de azoto não proteico (ANP) para os dias de armazenagem estudados. As amostras da série P72 apresentaram valores superiores ($p < 0,05$) às restantes séries, como foi notado em 1.3, o que é indicativo de uma maior desnaturação das proteínas. Foi aparente uma tendência de diminuição da fracção não proteica até T21, mas a diferença entre dias não se mostrou estatisticamente significativa para esta ou qualquer outra das séries. Esperar-se-ia um aumento do azoto não proteico conforme a extensão da proteólise, dado que a fracção solúvel em TCA consiste em pequenos péptidos (2-20 resíduos de aminoácidos), aminoácidos livres e azoto amoniacal (Soares, 2013). Em vez disso, registaram-se apenas pequenas variações que, em conjunto com os resultados anteriores, indicam que a proteólise não é um factor determinante no caso de P63 por 90 dias, ou no caso de soro SP por 21 dias.

No caso das amostras P72, a tendência de diminuição do ANP nas primeiras 3 semanas poderá ser indicativa de consumo de azoto não proteico por parte da flora microbiana discutida na secção anterior. A partir do dia 21 observou-se uma estabilização do ANP que coincide com o início da fase estacionária da população microbiana nestas amostras, podendo os aminoácidos ser o factor limitativo do crescimento dos B&L. No caso das amostras SP, no entanto, não foi registada tendência de diminuição do azoto não proteico ou amoniacal, apesar da existência duma microflora em crescimento. Isto poderá ser devido a uma menor disponibilidade inicial de aminoácidos livres. Tal como discutido na secção anterior, uma pasteurização incompleta poderá ajudar ao crescimento da microflora sobrevivente ao desnaturar as proteínas e libertar aminoácidos.

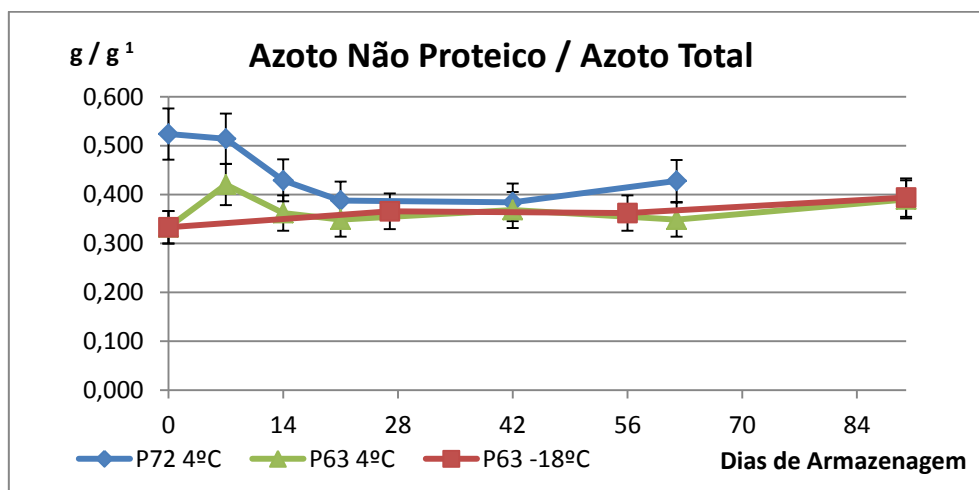


Figura III.14 - Resultados do azoto não proteico para as séries P72/4°C, P63/4°C e P63/-18°C

¹ g / g – Rácio entre o teor de azoto não proteico (g L^{-1}) e o teor de azoto total (g L^{-1}).

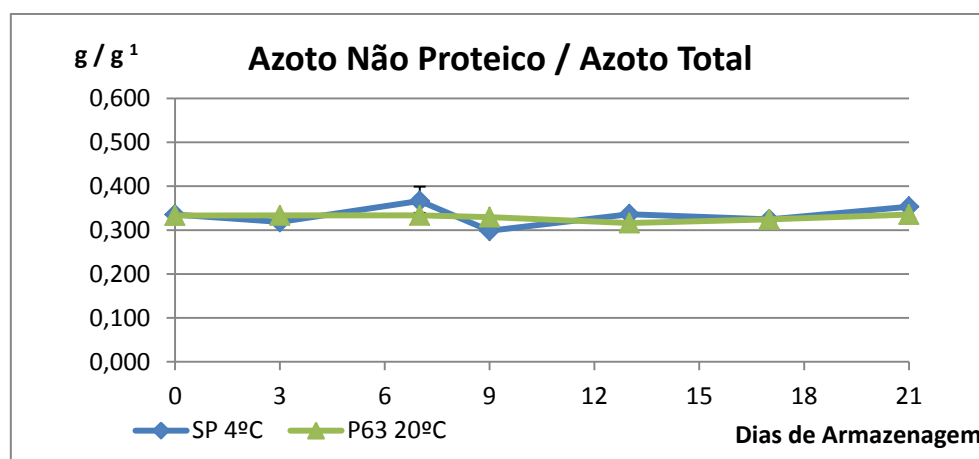


Figura III.15 - Resultados do azoto não proteico para as séries P63/20°C e SP

¹ g / g – Rácio entre o teor de azoto não proteico (g L^{-1}) e o teor de azoto total (g L^{-1}).

Apesar do soro em bruto poder ser utilizado para vários fins, os estudos de estabilidade existentes na literatura são geralmente efectuados no soro processado (concentrado ou em pó) ou no produto em que o soro foi incorporado, pelo que não foi possível encontrar avaliações da estabilidade microbiológica e proteolítica de soro em bruto que possam servir de comparação.

De notar que a acção proteolítica (enzimática ou térmica) irá também libertar aminoácidos que têm efeito nas propriedades organolépticas do produto, visto que alguns aminoácidos têm sabor doce (Glicina, Serina, Treonina, Alanina, Prolina), ácido (Histidina, Glutamina, Asparagina) ou amargo (Arginina, Metionina, Valina, Leucina, Fenilalanina, Tirosina, Isoleucina, Triptofano) (McSweeney P. L., 2004). Assim, uma maior fracção de azoto amoniacal e não proteico no soro P72, logo após a pasteurização, é sugestivo de diferentes propriedades organolépticas que devem ser testadas.

Os resultados da evolução das fracções azotadas estudados permitem afirmar que a proteólise não é um factor de grandes alterações no produto nos tempos estudados. A P72 apresentou mais variações, possivelmente ligadas ao desenvolvimento microbiano já discutido, e, dado que as proteínas do soro são valorizadas na sua forma nativa (não desnaturada), a P63 será preferível por causar uma desnaturação menos severa. As séries P63 e SP não apresentaram proteólise nos binómios (temperatura de pasteurização)x(tempo de armazenagem) estudados.

3. Avaliação das propriedades funcionais

De forma a compreender as funcionalidades do soro de iogurte em bruto foram efectuados ensaios para avaliar as suas propriedades espumante e emulsionante. Pretende-se que estes resultados sejam uma abordagem preliminar à avaliação da possibilidade de incorporação do soro noutros produtos ou ao desenvolvimento de bebidas lácteas à base de soro.

Para compreender os resultados obtidos na avaliação das propriedades funcionais do soro de iogurte é necessário ter em mente que as propriedades de cada tipo de proteína dependem do seu estado de desnaturação, pH, teor de lípidos (mesmo que residual), teor de sólidos totais, e força iónica da solução (Zall, 1992). Apesar de se encontrarem vários estudos na literatura sobre o conjunto das proteínas do soro, a maioria é efectuada em soro ultrafiltrado e desionizado, que é então reconstituído e geralmente neutralizado ou levado a um determinado pH pretendido. Assim, tenta-se minimizar o número de variáveis para melhor interpretar as diferenças observadas e comparar soros de leite de origens distintas (tipo de queijo, soro ácido, tipo de animal, processo, etc.).

No presente trabalho, o soro foi analisado na sua forma não processada (em bruto), tendo os ensaios sido realizados com novos lotes de soro. Assim, os resultados que se seguem foram interpretados assumindo uma composição semelhante à obtida para as anteriores amostras, à excepção dos pH e condutividade, que se apresentam na Tabela III.5. Estes resultados são muito próximos dos obtidos anteriormente (ver secção 1 deste capítulo), excepto o pH do soro de iogurte magro que se apresentou consideravelmente inferior. Isto pode ter sido devido a um maior tempo de incubação deste lote durante o fabrico do iogurte, resultando numa maior produção de ácido láctico pelas LAB. Observaram-se também, como anteriormente, as mesmas tendências de diminuição do pH com a temperatura de pasteurização no soro de leite gordo, mas não no soro de leite magro. O soro de leite magro, devido à maior carga positiva disponível a pH mais baixo, sofre uma desnaturação das proteínas por pasteurização com mecanismos e cinética diferentes dum soro com pH entre 4 e 5 (Harwalkar, 1980). A pH próximo de 2,5, a desnaturação das proteínas do soro resulta num desdobramento das proteínas, mas sem agregação e eventual precipitação. Este facto tem sido atribuído a uma menor capacidade dos grupos sulfatados para estabelecer pontes de enxofre. A este pH, a desnaturação é considerada incompleta e as proteínas ou os seus fragmentos mantêm uma boa solubilidade. (Harwalker, 1979; Mulvihill & Donovan, 1987)

Tabela III.5 - pH e condutividade das amostras utilizadas para a análise das propriedades funcionais

Amostra	pH	Condut. (mS cm ⁻¹)
SP magro	3,69 ± 0,01	6,32 ± 0,02
P63 magro	3,82 ± 0,00	11,32 ± 0,00
P72 magro	3,93 ± 0,01	9,74 ± 0,00
SP gordo	4,27 ± 0,00	6,63 ± 0,03
P63 gordo	4,22 ± 0,02	10,97 ± 0,04
P72 gordo	4,13 ± 0,01	10,03 ± 0,00

Quanto às restantes características do soro, assumiu-se que o soro de leite magro apresenta mais proteína, lípidos, cinza e sólidos totais que o soro de leite gordo, mas que este terá maior teor de cálcio, tal como verificado pelos resultados analisados e discutidos na secção 1 deste capítulo.

3.1. Propriedades Espumantes (PE)

As espumas são definidas como dispersões de gás em líquido ou de gás em sólidos. Um agente espumante é aquele que tem a capacidade de se situar na interface ar-água, estabilizando a interface e aumentando a capacidade de incorporar ar no produto. Na sua forma mais simples, uma espuma consiste numa bolha de gás rodeada por uma fase contínua. (Foegeding & Davis, 2011)

As características das proteínas do soro que contribuem para um bom desempenho como agente espumante são: a flexibilidade das suas moléculas que permite a sua orientação na interface ar-líquido, expondo os seus centros hidrofóbicos na fase gasosa; e a criação de ligações variadas (pontes de hidrogénio e enxofre) com as outras moléculas da interface e da fase líquida, contribuindo para a resistência e viscoelasticidade da interface. (Schmidt, *et al.*, 1984)

Os valores de capacidade de formação de espuma (FE), capacidade de expansão da espuma (ExE) e estabilidade da espuma (EE) obtidos são apresentados na Figura III.16. Notou-se que o soro de leite magro apresentou melhores resultados de FE e ExE do que o soro de leite gordo, independentemente do tratamento de pasteurização. Os resultados FE e ExE mostraram ter uma relação directa entre eles, o que é decorrente de ser um cálculo diferente das mesmas variáveis. Alguns autores optam por medir a capacidade espumante por um cálculo único (Patel & Kilara, 1990; Sanmartín, *et al.*, 2012).

Os resultados da EE foram muito baixos, quando comparados com valores apresentados por Sanmartín *et al.* (2012) para a ovalbumina (56% a pH 7 e 48% a pH 4). Os mesmos autores testaram concentrados de soro reconstituídos e obtiveram valores de redução de 50% do volume de espuma em entre 2 a 15 minutos, o que é concordante com os resultados apresentados. Não se notou uma correlação da EE com a temperatura de pasteurização, sendo que os valores obtidos para a P72 foram significativamente mais baixos que para as restantes amostras. Isto poderá dever-se à desnaturação de algumas proteínas durante a pasteurização, o que terá provocado alterações que se mostraram desfavoráveis à formação da rede reticular que estabilizaria a espuma. Estas alterações poderão ser de conformação das proteínas, quebra da cadeia peptídica ou agregação e eventual precipitação das proteínas. (Foegeding & Davis, 2011) As amostras SP também terão sofrido alguma desnaturação no pré-tratamento aplicado ao leite para o fabrico do iogurte, como vimos na secção 2.1 do Capítulo I, o que justifica que também

tenham apresentado resultados baixos de EE. A desnaturação das proteínas afecta negativamente a sua solubilidade. Patel e Kilara (1990) encontraram uma correlação directa entre a EE e a solubilidade das proteínas, superada apenas pela correlação directa com o teor de cálcio.

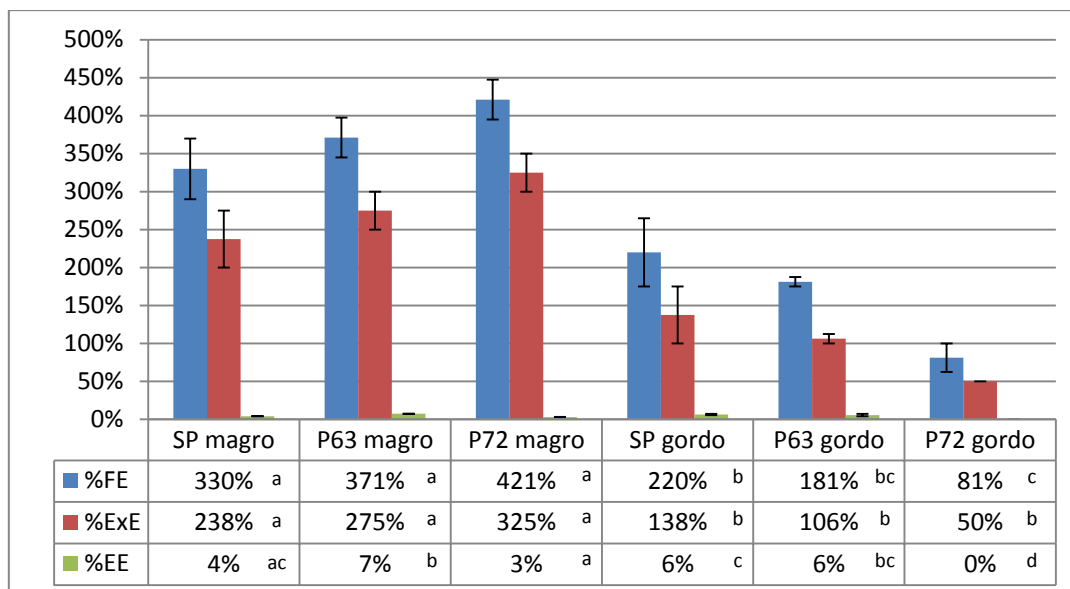


Figura III.16 - Resultados de FE (%), ExE (%) e EE (%) para as várias amostras estudadas

Letras na mesma linha assinalam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$)

O pH influencia as PE por alteração da solubilidade das proteínas devido ao seu ponto isoeléctrico. A solubilidade, por sua vez, tem uma relação directa com as PE por permitir a reorientação das proteínas para expor os seus grupos hidrofóbicos na interface ar-líquido (Dissanayake & Vasiljevic, 2009). Dado que o ponto isoeléctrico das α -La, β -Lg, e BSA é 4,2-4,5, 5,4, e 5,1, respectivamente, a solubilidade é mínima em valores de pH entre 4 e 5 e aumenta quando o pH se afasta destes valores (De Wit & Klarenbeek, 1984; Yamauchi, *et al.*, 1980). Segundo Mulvihill e Donovan (1987), as entalpia e cinética da desnaturação das proteínas do soro são dependentes do pH: a pH entre 4 e 5 (como no soro de iogurte gordo), a pasteurização causa uma maior desnaturação e agregação/precipitação das proteínas, do que a pH entre 3 e 4 (soro de iogurte magro). Neste último intervalo, a agregação das proteínas desnaturadas é menor (apesar de continuar a existir desnaturação), pelo que a pasteurização cria moléculas de proteína desnaturada que são benéficas à formação de espuma, mas que não precipitam. Isto é concordante com os resultados obtidos, mas poderá ser apenas um dos factores que influenciou os resultados.

A capacidade espumante (FE e ExE) obtida mostrou estar directamente correlacionada com o teor de proteína e de cinza, e inversamente correlacionada com os teores de cálcio, fósforo e lípidos. Isto é concordante com os resultados de Patel e Kilara (1990) no que respeita aos teores de cinza e cálcio, mas discordante quanto ao teor de lípidos.

O teor de lípidos, mesmo que residual, tem mostrado ter uma influência significativa nas capacidades espumantes resultante de vários mecanismos: destabilizam as interfaces devido à sua elevada tensão superficial, formam complexos proteína-lípidos-fosfolípidos que capturam as ligações hidrofóbicas das proteínas que ficam menos disponíveis para estabilizar as interfaces

líquido-ar (ou líquido-líquido, no caso duma emulsão), e inibem a adsorção de proteínas na interface. (De Wit & Klarenbeek, 1984; Sanmartín, *et al.*, 2012)

Um maior teor de lípidos no soro de leite magro poderia ter resultado numa menor capacidade espumante, mas podemos assumir também uma maior concentração de proteínas e cinza, que teriam o efeito inverso. Para além disso, o soro de leite gordo terá maior teor de cálcio que poderia facilitar a FE, mas um pH mais próximo do ponto isoeléctrico das proteínas que diminui a sua solubilidade e, portanto, as PE espumantes.

As PE variaram também consoante o tratamento térmico aplicado ao soro: a aplicação de temperatura desnatura (reversível ou irreversivelmente) as proteínas, com implicações na sua solubilidade, capacidade de formar agregados e eventualmente precipitar, e no estado das suas espécies terminais e ligações que formam (ver secção 1.3 deste capítulo). Devemos considerar que as amostras sofreram pré-tratamentos diferentes para o fabrico do iogurte, sendo que o soro de leite gordo foi aquecido até 68-70 °C e o soro de leite magro apenas a 55-57 °C. Esta diferença de pré-tratamentos significa que as proteínas do soro de leite gordo sofreram uma desnaturação prévia, ao contrário das do soro de leite magro. Isto tem implicações na composição final de cada proteína no soro, dado que as proteínas formam mais ou menos ligações à estrutura reticular do coágulo consoante o seu estado de desnaturação. Tem também implicações no estado de desnaturação que resulta da pasteurização aplicada posteriormente com a finalidade de efectuar o presente estudo de estabilidade.

Assim, o pré-tratamento do leite gordo permitiu a desnaturação da α -La e da BSA que terão sido parcialmente retidas no iogurte, dado que a desnaturação permite que formem ligações com a caseína e os lípidos durante a formação do coágulo (Chandan & Kilara, 2013). Ao aplicar posteriormente a P63 ao soro de leite gordo terá havido muito pouca BSA para desnaturar, pelo que esta pasteurização terá afectado as proteínas do soro apenas na libertação de algumas espécies aminoácidas, como vimos na Tabela III.3 - Resultados das fracções de azoto amoniacal, solúvel e não proteico para cada tratamento. De facto, os resultados das PE das amostras SP gordo e P63 gordo não são estatisticamente diferentes. Ao pasteurizar a 72 °C, no entanto, terá havido já desnaturação da Ig e agregação/precipitação de proteínas com redução das proteínas dissolvidas. Sanmartín *et al.* (2012) observaram este efeito também numa pasteurização a 63 °C por 30 minutos de soro reconstituído. Uma redução das proteínas dissolvidas resulta numa menor capacidade espumante, o que é concordante com o resultado (Patel & Kilara, 1990).

Contrariamente, para o soro de leite magro a desnaturação parcial das proteínas durante a pasteurização, não tendo havido desnaturação no pré-tratamento, terá melhorado o seu desempenho funcional. Um tratamento térmico moderado provoca alterações conformacionais que expõem os grupos hidrofóbicos das proteínas sem causar agregação (De Wit & Klarenbeek, 1984). Mesmo assim, apesar do ligeiro aumento, os resultados não foram estatisticamente diferentes.

Finalmente, há que notar que vários autores (De Wit & Klarenbeek, 1984; Zall, 1992) concluíram que a armazenagem a 4 °C pode reverter os efeitos do tratamento térmico por reversão da desnaturação das proteínas e dissociação dos complexos lipídicos, pelo que a utilização do soro pelas suas PE deverá considerar ainda este factor.

Uma variedade de métodos podem ser utilizados para medir as PE de proteínas, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos. A Tabela III.6 apresenta alguns valores obtidos por um método semelhante ao utilizado no presente trabalho para algumas proteínas. Com a ressalva que o tempo de batimento e o equipamento utilizado não foram iguais, podemos dizer que o soro em bruto avaliado tem uma capacidade de formação de espuma que poderá ser considerada na sua valorização.

Tabela III.6 - Capacidade de formação de espuma de algumas proteínas

Proteína*	FE (%)
β -Lg	480
BSA	280
Isolado de proteínas do soro	600
Caseína	460
Proteína de soja hidrolisada	500
Albumina	240
Gelatina (de pele de porco)	760

* 0,50% em água destilada (Poole, *et al.*, 1984)

As proteínas do soro podem ser usadas para facilitar a formação de espuma em *toppings* para bolos, mas a estabilidade das espumas formadas nunca é tão boa como usando caseinatos, que são geralmente preferidos (Zall, 1992). A boa capacidade espumante demonstrada pelo soro em bruto, no entanto, abre possibilidades à sua utilização em bebidas como *smoothies* e batidos, em que a espuma é formada na altura do consumo com um curto tempo de vida (Campbell & Mougeot, 1999).

3.2. Capacidade Emulsionante (CE)

Uma boa CE permite o uso das proteínas como agentes emulsionantes, o que tem várias aplicações em sistemas alimentares. Entre os alimentos em que as proteínas do soro mais são utilizadas encontram-se os gelados, molhos para saladas, molhos de carne e salsichas (emulsões de carne) (Patel, *et al.*, 2015). No Capítulo IV são discutidas as possibilidades de valorização do soro em bruto.

Um agente emulsionante é aquele que tem a capacidade de estabilizar uma mistura de dois líquidos imiscíveis (por exemplo, óleo e água) (Patel, *et al.*, 2015). A CE é muitas vezes medida como a quantidade de óleo que pode ser misturada com água (ou outros dois líquidos imiscíveis) até se dar a inversão da emulsão. Esta inversão consiste na passagem do líquido disperso (por exemplo o óleo que está a ser misturado em água) para a fase contínua (passando a água a estar dispersa em óleo). Dado que a condutividade do óleo e da água são bastante diferentes, é possível determinar o ponto de inversão da emulsão por medição da sua condutividade. (Souza, 2009)

A Figura III.17 apresenta os resultados da condutividade da emulsão entre o óleo e a amostra de soro de leite gordo SP, bem como as respectivas primeira e segunda derivadas. O

ensaio foi idêntico para as restantes amostras, tendo sido fácil distinguir o ponto de inversão da emulsão principalmente através da representação gráfica da 1ª derivada.

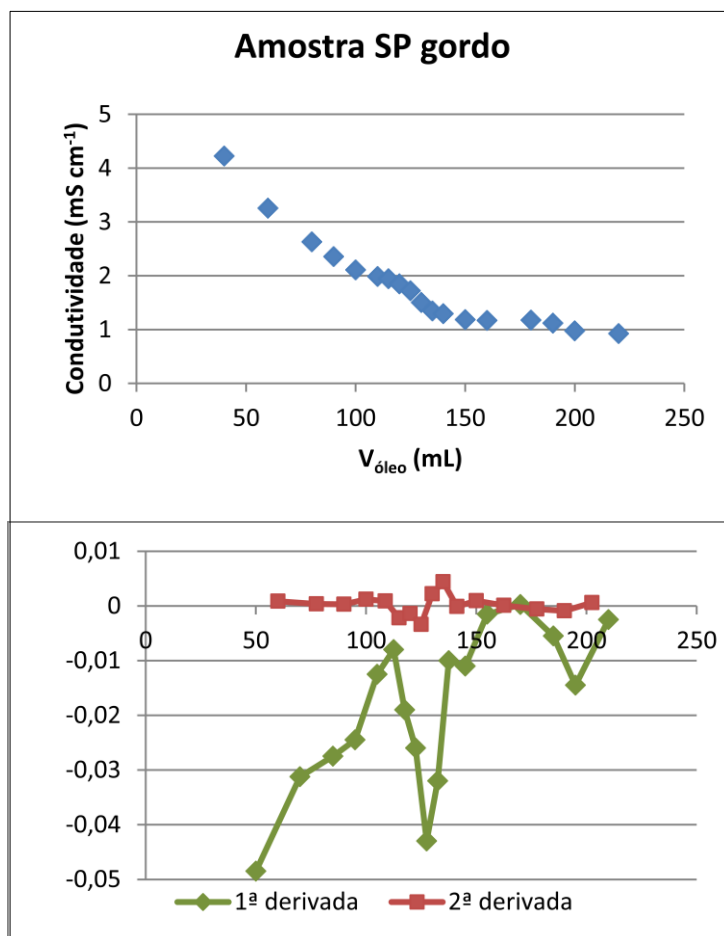


Figura III.17 - Resultados e expressão das 1ª e 2ª derivadas para a amostra SP gordo

Todos os ensaios apresentaram dois picos na 1ª derivada, sendo que o primeiro corresponderá à inversão da emulsão (óleo-em-água para água-em-óleo) e o segundo a uma mudança descrita em Souza (2009) como de água-em-óleo para óleo-em-água-em-óleo, em que a emulsão passa a ser constituída por uma parte externa de óleo e uma parte interna que consiste numa emulsão de óleo em água. Na fase de teste do método, foi ainda notado um pico inicial (cerca de 40% de óleo) que corresponderá à inversão de óleo-em-água para água-em-óleo-em-água (dados não apresentados). Estas alterações foram directamente visíveis durante os ensaios, mas não com a precisão necessária para efectuar a medição visualmente.

No caso das amostras P63 magro, P63 gordo e P72 gordo, o ensaio foi repetido para confirmar o ponto de inversão e, neste caso, o resultado de CE apresentado adiante é a média dos dois ensaios efectuados (desvio padrão 0,01 para cada caso).

O volume de óleo correspondente à inversão da emulsão foi calculado por interpolação da 2ª derivada ao valor $y=0$. Os resultados, expressos em gramas de óleo por miligrama de proteína, estão representados na Figura III.18, sendo que letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Os resultados na literatura são muito variados consoante a origem da proteína e respectivo tratamento, e enquadram os resultados obtidos no presente estudo. Pagno *et al.* (2009) observaram valores entre 0,21 e 0,37 g mg⁻¹, usando o mesmo método em várias concentrações de proteína de soro reconstituída e neutralizada, e utilizando óleo de soja. Estes autores citam também valores entre 0,15 e 0,25 g mg⁻¹ para hidrolisados de caseína, e entre 0,40 e 0,50 g mg⁻¹ para hidrolisados de proteínas lácteas. Zall (1992) apresenta valores típicos de 0,30 a 0,49 g de óleo de milho por mg de proteína para concentrados de proteína de soro, variando conforme o processo de recuperação dessas proteínas. De notar, no entanto, que a CE é altamente dependente do aparelho onde é feita a emulsão (Dissanayake & Vasiljevic, 2009; Zall, 1992), pelo que deve ser exercida cautela na comparação de resultados.

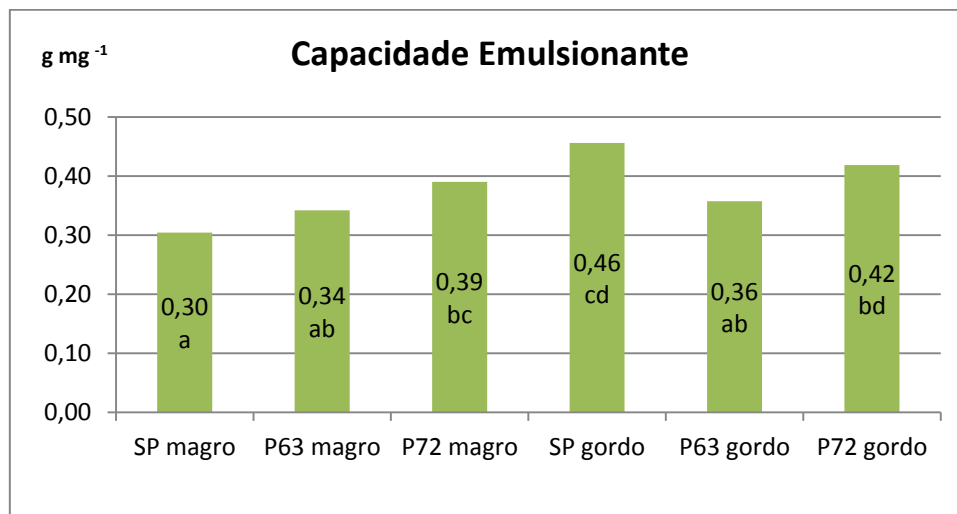


Figura III.18 - Resultados da capacidade emulsionante para as várias amostras estudadas

Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)

Os resultados do presente trabalho não foram completamente concordantes com o que seria teoricamente esperado no que respeita ao teor de lípidos, teor de proteínas, pH e temperatura de pasteurização.

Os lípidos estão estabilizados pelas proteínas, tornando-as indisponíveis para estabilizar o óleo adicionado, e vários autores relatam uma correlação negativa entre o teor de lípidos e a capacidade emulsionante (Pagno, *et al.*, 2009; Patel & Kilara, 1990; Sanmartín, *et al.*, 2012). De facto, o soro de leite gordo SP, que mostrou ter um menor teor de lípidos, apresentou valores significativamente superiores ao magro de igual tratamento ($p < 0,05$). Essa diferença não foi significativa para as amostras P63 e P72. Isto poderá ser devido à agregação de proteínas durante as pasteurizações, que não será igual entre o soro de leite magro e o gordo devido aos pré-tratamentos no fabrico do iogurte, como foi exposto na secção anterior. Para além do pré-tratamento, podemos ainda considerar que o soro de leite gordo possui um pH mais próximo do ponto isoeléctrico das proteínas do soro e um maior teor de cálcio, ambos factores que facilitam a precipitação de proteínas às temperaturas de pasteurização (De Wit & Klarenbeek, 1984).

Por outro lado, o pH próximo do ponto isoelétrico das proteínas reduz a sua solubilidade e, portanto, deveria reduzir a CE. De acordo com Yamauchi *et al.* (1980), a estabilidade da emulsão depende fortemente do pH dado que diferentes proteínas do soro são adsorvidas na interface água-óleo a diferentes pH, bem como é diferente a sua solubilidade e capacidade de formar ligações (iónicas ou hidrofóbicas) com outras moléculas. Assim, a solubilidade e a capacidade emulsionante deverão ser mínimas a pH 4-5 e aumentarão para pH mais ácido ou básico. O pH das amostras utilizadas nesta fase do trabalho está apresentado na Tabela III.5, e como se pode ver não apresenta correlação com a CE observada, pelo que teremos que assumir que este factor não foi o mais determinante para os resultados obtidos.

Também o teor de proteína não será determinante para a CE. Apesar da importância do teor de proteína reconhecida por vários autores, Yamauchi *et al.* (1980) e Patel e Kilara (1990) reportam correlação apenas com a estabilidade da emulsão e não com a capacidade de formação da emulsão.

Finalmente, quanto à tendência de aumento da CE com a temperatura de tratamento, o resultado (que não é estatisticamente significativo a 95% de confiança) é contrário ao teoricamente esperado. Geralmente é assumido que a desnaturação diminui a capacidade emulsionante das proteínas devido à perda de solubilidade, como confirmaram Britten e Giroux (1991), Mulvihill e Donovan (1987) e Patel e Kilara (1990). Mas alguns autores (Dissanayake & Vasiljevic, 2009) registaram um aumento significativo ($p < 0,05$) do índice de actividade espumante com a aplicação de tratamento térmico que atribuíram a uma combinação de factores de composição, processamento e métodos, que terão contribuído para uma maior afinidade das proteínas com a fase dispersa.

Capítulo IV. Valorização do soro de iogurte

Um dos grandes desafios que se põe às pequenas e médias indústrias de iogurte concentrado é a valorização do soro na sua forma bruta (líquido não processado ou com um processamento mínimo), de forma a minimizar os custos energéticos decorrentes da estabilização do soro por concentração e ultrafiltração. O uso do soro nesta forma exclui algumas utilizações que tiram partido das funcionalidades de proteínas, como a sua adição a iogurtes (não concentrados) (Lucey & Singh, 1997), mas mesmo a transformação do soro em pó apresenta restrições ao seu uso. Nos últimos 25 anos, uma das principais limitações ao uso das proteínas do soro como ingredientes funcionais tem sido a imprevisibilidade e inconsistência da sua performance nos produtos. Estas imprevisibilidade e inconsistência são devidas principalmente a três factores: (i) os efeitos do processamento térmico e mecânico na funcionalidade das proteínas do soro; (ii) variações de composição nos componentes principais e menores, decorrentes da sazonalidade e do processamento, e os efeitos da interação entre esses componentes na funcionalidade do soro; e (iii) o comportamento físico e químico dos principais componentes funcionais (proteínas, lípidos e minerais) em diferentes sistemas alimentícios. (Smithers, 2008)

Estes efeitos são ainda interdependentes, tornando o comportamento funcional das proteínas numa equação com muitas variáveis. As variações sazonais na composição do leite que alteram a percentagem de cada proteína e de cálcio, além de terem influência na funcionalidade das proteínas do soro, resultam numa resistência diferente a tratamentos térmicos, como vimos na secção 3 do Capítulo III. Por exemplo, um elevado teor de cinza pode inibir as características espumantes e emulsionantes das proteínas do soro, e o conteúdo dessa cinza tem também um papel determinante na capacidade de floculação das proteínas e, portanto, na sua tendência para precipitar durante o processamento. Também pequenas alterações na produção do iogurte concentrado, geralmente efectuada por métodos tradicionais, podem alterar factores importantes como o pH e força iónica do soro, alterando a capacidade das proteínas do soro formarem ligações entre elas ou com outros elementos do produto. (Johansen, *et al.*, 2002; Yamauchi, *et al.*, 1980)

Por tudo isto, a valorização de soro de leite deverá ser estudada caso a caso, isto é, para cada proveniência do soro, cada tratamento a que o soro é submetido, e cada destino considerado. É importante, pois, que pequenas e médias indústrias encontrem primeiramente um destino a dar ao seu subproduto, e só então adequem o tratamento a aplicar às características necessárias para o seu fim.

Na Tabela IV.1 apresentam-se as mais comuns utilizações do soro ácido e do soro “doce” (soro de queijo, pH≈6) na indústria alimentar. Nem todas as aplicações mencionadas são possíveis com o soro na sua forma bruta e algumas utilizações pressupõem algum tratamento, tal como concentração ou desmineralização. No entanto, um produtor que considere incorporar soro de leite no seu produto terá sempre que investigar o seu desempenho, caso a caso, e adaptar a formulação do seu produto à nova matéria-prima. Apesar de ser eventualmente mais

cómodo a utilização do soro na forma de pó, a sua utilização na forma bruta traz vantagens económicas para o utilizador e para o produtor que pretende valorizar o seu resíduo. Muitas utilizações onde se tem usado o soro em pó poderão ser investigadas para soro em bruto.

Tabela IV.1 - Aplicações de soro de leite

A. Aplicações de soro de leite doce
Sorvetes e revestimentos gelados, <i>toppings</i> e xaropes
Pães doces, pão, biscoitos e bolos
Coberturas de bolos, revestimentos de doces, <i>fudge</i> , caramelos e chocolate
Margarina, alimentos à base de queijo, molhos e aperitivos
Sumos de fruta e bebidas
Sopas, alimentos para bebés e pudins
Produtos de carne
B. Aplicações de soro de leite ácido
Bebidas com aromas de fruta e produtos lácteos fermentados
Queijo, molhos e patês
Bolachas, pão e produtos de panificação
Molhos para saladas
Gelados de iogurte
Salsichas e produtos de carne processada

Adaptado de Kosikowski (1979) e Morr (1992)

Discutem-se de seguida algumas aplicações onde já foi testada ou poderá ser testada a utilização de soro em bruto.

Produção de lactose e seus derivados

Mesmo havendo lugar a uma separação e recuperação das proteínas do soro, continuam a existir grandes quantidades dum subproduto rico em lactose e minerais. Avanços no conhecimento da química da lactose permitiram desenvolver técnicas de cristalização, isolamento e purificação que permitem a recuperação deste componente, e sua eventual transformação em derivados potencialmente importantes para aplicações em produtos alimentares e não alimentares. (Smithers, 2008; Morr, 1992)

A lactose é geralmente fabricada mediante concentração até 50-65% de sólidos, de soro bruto, desproteínado ou ultrafiltrado, e arrefecimento até 86 °C ou inferior, com agitação, para promover a cristalização. Os cristais de α -monoidrato que se formam são recuperados por decantação, centrifugação e lavagem com água, para se obter a lactose em bruto. A lactose é utilizada como alimentação animal, substrato para fermentação ou pode ser química ou enzimaticamente modificada para produzir variados derivados. Entre estes, o lactitol é produzido por hidrogenação catalítica da lactose e tem galactose e sorbitol como componentes. O sorbitol, para além das suas aplicações como edulcorante, tem propriedades humectantes e espessantes utilizadas nas indústrias cosmética, alimentar, tabaqueira, têxtil e outras. (Morr, 1992; Bttco Overseas Pvt. Ltd.)

Outros derivados da lactose encontram-se mencionados na Figura I.3 - Esquema resumo dos principais tratamentos aplicados ao soro e seus produtos.

Bioprodução de ácidos, álcoois e outros

Um elevado teor de lactose faz do soro também um interessante substrato para microrganismos e a sua capacidade de síntese de compostos pode ser aproveitada. Um dos principais compostos assim produzidos é o ácido lácteo, também produzido durante o fabrico do iogurte. A bioprodução de ácido lácteo tem como vantagem, quando comparado com uma síntese química, poder produzir ácido láctico opticamente puro, dado que é possível escolher uma LAB que produza apenas um dos enantiómeros deste composto. O ácido láctico opticamente puro é utilizado na produção de polímeros biodegradáveis entre outras aplicações, pelo que a procura de compostos com estas características tem aumentado. (Panesar, *et al.*, 2007)

Muitas bactérias fermentam a lactose com produção de ácido lácteo. Enquanto na produção de iogurte a escolha das LAB a utilizar recai em questões sensoriais, na produção industrial de ácido láctico procura-se bactérias que obtenham o maior rendimento ao menor custo. Assim, procura-se uma espécie que produza maioritariamente ou somente ácido láctico na fermentação. O *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* é muitas vezes utilizado, mas o *Lactobacillus helveticus* produz maior quantidade de ácido láctico e o *Lactobacillus casei* tem a vantagem de não necessitar de temperaturas tão elevadas. (Mehaia & Cheryan, 1986; Panesar, *et al.*, 2007)

Mehaia e Cheryan (1986) desenvolveram um processo de produção de ácido láctico por *L. bulgaricus*, em biorreactor de membrana com reciclo, tendo alcançado a utilização completa da lactose dum permeado de soro ácido suplementado com extracto de levedura. A suplementação com uma fonte adicional de azoto é necessária por se tratar de permeado de soro (sem proteína) e considerada essencial para uma boa produção de ácido lácteo. Os resultados são potenciados utilizando soro hidrolisado que é mais facilmente utilizado pelos microrganismos. A concentração da lactose é também um factor importante para um bom desempenho pelo que o soro bruto terá de sofrer tratamento de concentração para ser usado desta forma. (Panesar, *et al.*, 2007)

Para além do ácido lácteo, outros compostos podem ser produzidos desta forma. Mukhopadhyay *et al.* (2005) estudaram a produção de ácido glucónico por *Aspergillus niger* usando soro como substrato. Este estudo foi efectuado com células livres e imobilizadas tendo obtido um maior rendimento com células imobilizadas, que podem ainda ser reutilizadas. A imobilização das células em biorreactores tem vindo a ser cada vez mais utilizada por obter melhores rendimentos devido à protecção contra condições adversas que o agente imobilizador confere (Panesar, *et al.*, 2007). Cavalcante *et al.* (2014) também usaram *A. niger* mas desta vez para obter ácido cítrico, com o intuito adicional da redução da carência química de oxigénio no soro, o que foi conseguido. Outros ácidos orgânicos assim produzidos foram os ácidos acético, propiónico, lactobiónico, cítrico, e itacónico (Siso, 1996).

Outra bioprodução que tem vindo a ser estudada é a produção de álcool de qualidade alimentar. Domingues *et al.* (1999) conseguiram uma boa produtividade de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* usando o soro de queijo como única fonte de carbono e energia, e

produzindo cerca de $10 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de etanol, com consumo total da lactose. Athanasiadis *et al.* (2002) experimentaram a mesma produção com grânulos de *kefir* (bebida láctea alcoólica tradicional russa) contendo *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia* e várias espécies de *Lactobacillus*, obtendo uma produção mais modesta de $2,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Já Murari (2013) utilizou a levedura *Kluyveromyces marxianus*, mas com o intuito de produzir bioetanol para fins combustíveis.

Outros produtos podem ser bioproduzidos utilizando soro de leite como substrato. Entre os mais mencionados estão a vitamina B12 (Bullerman & Berry, 1966), o glicerol (Siso, 1996) e a goma xantana, um biopolímero comercial com características reológicas e de estabilidade com utilidade nas indústrias alimentar, petrolífera e petroquímica, agroquímica e farmacêutica (Morr, 1992). Alguns aminoácidos (glutâmico, lisina, treonina) podem ser obtidos a partir do soro por diferentes microrganismos e processos (Siso, 1996). A produção da frutose-difosfato, com utilização em farmacologia, pode ser efectuada através de bioconversão de soro de leite com *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada (Compagno, *et al.*, 1993). O soro constitui também um substrato potencial para compostos aromatizantes voláteis produzidos por *Kluyveromyces lactis*, como o ácido giberélico, e enzimas, como a poligalacturonase (Hobman, 1984).

Preservação e fermentação de produtos

O baixo pH e elevado conteúdo de ácido láctico do soro ácido, que se tornam um impedimento à sua utilização para muitos fins, transformam-se numa mais-valia quando se trata de preservar produtos como alface, cenoura e frutos cortados. O permeado de soro a 75% apresentou boas características desinfectantes para o processamento mínimo de alface, quando comparado com o hipoclorito geralmente utilizado (Santos, *et al.*, 2015). Martin-Diana *et al.* (2006) estudaram ainda o efeito de 3% de permeado de soro na inibição do escurecimento enzimático de alface e cenouras, observando que o efeito, apesar de existente, não era perceptível por observação visual.

O potencial antimicrobiano do permeado de soro tem sido estudado de forma preliminar e a sua aplicação em produtos minimamente processados mostrou uma boa actividade antimicrobiana, obtendo-se uma redução na contagem de microrganismos viáveis e sem efeito negativo sobre os atributos sensoriais em produtos tão variados como truta (Nykänen, *et al.*, 1998) e tomates cortados (Ahmed, *et al.*, 2012). As características do soro que podem contribuir para a actividade antimicrobiana são o seu pH baixo e a presença de ácido láctico, bacteriocinas termorresistentes e outros pequenos péptidos bioactivos. (Rico, *et al.*, 2007)

O soro, em especial o soro ácido, tem também sido utilizado para preservação de vegetais em vinagre (*pickles*). Este processo pode ser realizado em dois passos, uma primeira fermentação alcoólica com produção de etanol seguida de fermentação por bactérias produtoras de ácido acético (Parrondo, *et al.*, 2003), ou por uma produção directa do ácido acético pela *Propionibacterium spp.*, que consegue transformar tanto a lactose como o ácido láctico (Tuckett, *et al.*, 1996). Akpinar-Bayazit *et al.* (2007) compararam o uso de 2% de soro na preservação de cenoura cortada com o uso de 0,5% de ácido acético e concluíram que ambos os produtos apresentaram boa aceitação sensorial por um painel treinado.

Incorporação do soro noutros produtos

Os produtos processados que contêm leite na sua formulação são potenciais destinos para o soro de leite. Por exemplo, Madrona *et al.* (2008) usaram até 50% de soro em substituição do leite na formulação de doce de leite pastoso e obtiveram bons resultados microbiológicos, e outros autores com formulações semelhantes obtiveram boa aceitação sensorial do produto (Rocha, 2009).

Outros produtos que têm sido formulados com soro em bruto são os gelados de fruta (Fassio, *et al.*, 2009), sobremesas típicas (Aydin & Çakmakçi, 2014) e queijo do tipo *Cottage* (Monsoor, *et al.*, 2003). Os concentrados líquidos de soro e soro em pó são usados em cereais de pequeno-almoço, padaria e alimentos fritos, onde é desejado o desenvolvimento de uma crosta dourada (Morr, 1992).

O soro ácido tem sido utilizado em molhos para saladas como elemento emulsionante e substituto de gordura (Johnson, 2008), mas é geralmente utilizado em forma de soro em pó, por ser mais fácil controlar a sua composição. No entanto, têm sido feitas algumas investigações sobre a possibilidade do uso de soro em bruto, sendo que os resultados mostram que molhos de salada com soro de leite como fase aquosa e a adição de estabilizadores pode ser uma alternativa tecnológica para a indústria alimentar (De Cássia da Fonseca, *et al.*, 2009).

Os sorvetes são outro produto onde tem sido incorporado soro em pó e considera-se que é possível a substituição de 20-25% dos sólidos-não-gordura por sólidos de soro sem afectar as propriedades sensoriais (Morr, 1992).

O soro ácido também pode ser usado em produtos de carne processada como salsichas, mas nesse caso deverá ser desmineralizado, visto que o cálcio tem efeitos adversos na conservação da carne (Morr, 1992). Já no peixe, as propriedades antioxidantes e antimicrobianas do soro têm sido estudadas, por exemplo, em óleo de salmão (Tong, *et al.*, 2000) e em truta (Nykänen, *et al.*, 1998).

Bebidas à base de soro

Devido à simplicidade e interesse comercial das bebidas à base de soro de leite, muitas formulações foram desenvolvidas e os trabalhos nesta área foram revistos (Holsinger, *et al.*, 1974; Jeličić, *et al.*, 2008).

Em alguns países, principalmente no Médio Oriente e no Brasil, o método mais comum de produção de iogurte líquido é misturar iogurte natural com água, soro de queijo ou soro obtido da produção de iogurte concentrado (Tamime, 2006). Esta é a maneira mais simples e prática para um pequeno ou médio produtor de iogurte concentrado valorizar o soro sem necessidade de introduzir novo *know-how* na sua empresa. Por exemplo, o *Ayran*, uma bebida de iogurte turca, e o *Dough*, uma bebida tradicional no Irão, são fabricadas misturando um iogurte natural com cerca de 30 a 35% de água (ou soro) e 1% de sal (no caso do *Ayran*) ou hortelã (no caso do *Dough*), e por vezes pimenta ou pepino. Têm um tempo de vida limitado, dado que têm tendência a sedimentar, mas são uma opção simples e viável. (Köksoy & Kiliç, 2003)

Devido ao *flavour* lácteo natural do soro, em especial do soro de iogurte, muitas das bebidas desenvolvidas com soro incorporado são bebidas lácteas. Kar e Misra (1999) foram mais longe e chamaram “Wheyghurt”, em português “Sorogurte”, à bebida de soro desproteínado e

fermentado que desenvolveram. Também Souza Soares *et al.* (2008) formularam uma bebida, desta vez à base de soro bruto, ao qual juntaram 8 a 10 % de leite em pó e um *starter* para a obtenção dum iogurte líquido que obteve boa aceitação a nível sensorial. Pescuma *et al.* (2008) fizeram estudos sobre culturas *starter* apropriadas para a fermentação do soro, e Gallardo-Escamilla *et al.* (2007) avaliaram a adição de hidrocolóides a estas bebidas de forma a melhorar a sua textura e *flavour*. Estes últimos autores avaliaram ainda a diferença sensorial entre os vários tipos de soro, incluindo os vários tipos de soro ácido provindos de queijos do tipo fresco, concluindo que nestes casos o *starter* utilizado teve grande influência na experiência sensorial descrita.

Outra maneira de integrar o soro numa bebida é por mistura com sumo ou polpa de fruta ou vegetais, criando bebidas ricas em proteínas e vitaminas, hoje em dia muito apreciadas por atletas devido às características nutricionais da proteína de leite. Zoellner *et al.* (2009) estudaram ainda a sobrevivência de bifidobactérias numa bebida à base de soro e polpa de açaí, tendo concluído que se tratada duma opção tecnológica viável para uma bebida probiótica.

Devido ao *flavour* lácteo do soro, as bebidas assim formuladas têm mais sucesso quando são usados frutos cítricos, mas outros têm sido testados, como morango e uva (Holsinger, *et al.*, 1974). Oliveira (2011) desenvolveu bebidas à base de soro, contendo 10% (m/v) de sacarose e 5% (m/v) de preparado de frutas com sabor a mamão, banana e maçã. Metade das bebidas foi formulada com 100% de soro ácido e as restantes com 60% de soro ácido e 40% de soro doce, tendo sido obtida uma boa aceitação de todas as bebidas na análise sensorial. O soro pode ainda ser desodorizado com carvão activado, abrindo portas a outras experiências sensoriais (Holsinger, *et al.*, 1974).

As bebidas à base de soro e frutas, no entanto, têm pouco tempo de vida útil devido à tendência de sedimentação da fruta, o que não tem boa aceitação pelos consumidores. Por isso, as bebidas de soro fermentadas têm também sido vastamente estudadas. Para além das do tipo iogurte líquido já mencionadas, têm sido desenvolvidas bebidas alcoólicas à base de soro. Estas são geralmente obtidas por fermentação de soro desproteínado, usualmente por leveduras das espécies *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*, podendo dar origem a bebidas com baixo teor alcoólico (<1,5%), à chamada cerveja de soro (que pode ter adição de malte), ou ao vinho de soro (10-11% de teor alcoólico), estes últimos por processos mais elaborados. (Jeličić, *et al.*, 2008)

Para aumentar o tempo de vida útil de bebidas à base de soro, algumas soluções têm sido consideradas, nomeadamente o uso de ácido benzóico ou dióxido de enxofre (Steele, 2004), e óleo de folha de betle, cujas propriedades antimicrobianas e antioxidantes mostraram ter acção preservativa (Khare, *et al.*, 2009)

Outras utilizações

Outras aplicações têm sido estudadas e novas utilidades para o soro e seus derivados continuam a surgir. Soydemir (2008) estudou o uso de soro em pó como substrato para a produção de culturas *starter* para iogurte, e outros *starters* têm sido cultivados em base de soro com sucesso comercial, nomeadamente de espécies de leveduras *Kluyveromyces*, *Candida* e *Saccharomyces cerevisiae* (Siso, 1996).

A produção de metano é uma aplicação já posta em prática, geralmente associada ao tratamento do soro como efluente, reduzindo a carga poluente e produzindo energia (Siso, 1996).

O potencial do soro como agente de microencapsulação de produtos em pó também tem sido estudado, nomeadamente para a encapsulação de gordura de leite anidra (Young, *et al.*, 1993), e mais recentemente, no *spray-drying* de bifidobactérias (Castro-Cislaghi, *et al.*, 2012).

As empresas que possuem o soro como subproduto devem manter atenção quanto a novas aplicações que vão sendo desenvolvidas e que tenham interesse comercial.

Capítulo V. Conclusões

O soro de iogurte difere do soro de queijo (soro “doce” que é mais estudado na literatura) por possuir maior acidez, pH mais baixo, mais sólidos totais, cinza, fósforo e cálcio. Estes factores influenciam as suas propriedades funcionais e possíveis utilizações, mas podem ajudar à sua conservação na forma não processada. O processamento do soro deverá ser definido de acordo com o destino pretendido, dado que os tratamentos térmicos afectam as suas propriedades funcionais.

Uma nota a tirar da caracterização destes soros é que o soro de leite magro tem mais lípidos do que o soro de leite gordo, pelo que deverá haver o cuidado de não lhes chamar “soro gordo” e “soro magro” pois pode causar confusão. O teor de lípidos é baixo em ambos os soros e será importante apenas se os destinos considerados envolverem a utilização funcional para formação de espumas ou emulsões (o soro de iogurte gordo apresentou melhores propriedades emulsionantes e o de iogurte magro melhores propriedades espumantes).

Os tratamentos térmicos de estabilização testados causaram alterações nas proteínas dos soros. A desnaturação sofrida foi menor no soro de iogurte magro do que no de iogurte gordo devido aos pré-tratamentos aplicados para a produção do iogurte (mais forte no leite gordo do que no magro). Essa desnaturação foi evidente na análise das fracções azotadas, tendo-se verificado um aumento do azoto amoniacal e uma diminuição do azoto solúvel com o aumento da temperatura de pasteurização. O aumento do azoto não proteico foi verificado apenas para P72 indicando que esta pasteurização causa a desnaturação irreversível duma quantidade significativa de proteínas, em especial a BSA e as Ig.

Todas as amostras mostraram ser estáveis a nível químico (pH, acidez, °Brix, fracções proteicas) pelo menos por 21 dias. A nível microbiológico, a pasteurização a 63 °C por 30 minutos mostrou ser eficaz na eliminação de microrganismos e satisfazer os requisitos da Portaria nº 742/92 que define critérios microbiológicos para o iogurte (máximos de 10 UFC cm⁻³ de bolores e 10² UFC cm⁻³ de leveduras). Estas amostras apresentaram-se estáveis por 90 dias, a -18 e +4 °C, e por 21 dias a 20 °C, a nível microbiológico e químico.

O tratamento térmico a 72 °C por 1 minuto em *batch* não mostrou reduzir a carga microbiana do soro de forma a estender a sua vida útil, apresentando após 21 dias uma carga microbiana semelhante à do soro sem pasteurização. Esta pasteurização terá sido incompleta o que poderá ajudar ao crescimento da microflora sobrevivente, ao desnaturar as proteínas e libertar aminoácidos. Uma maior fracção de azoto amoniacal e não proteico poderá também resultar em diferentes propriedades organolépticas que devem ser testadas.

As amostras sem pasteurização apresentaram-se estáveis por 21 dias, apesar de haver desenvolvimento de B&L. Os valores de B&L encontraram-se acima dos valores estipulados para iogurtes pela Portaria nº 742/92 a partir dos 13 dias. Apesar de esta não ser uma obrigação legal para o soro de leite, a redução da carga microbiana é aconselhável para garantir a validade de 3 semanas pretendida. Um aumento da população de *S. thermophilus* em relação ao *L. bulgaricus* poderá favorecer a predominância das LAB sobre a restante flora presente durante mais tempo.

Estabelecer limites de pH para o soro (e para o iogurte que o origina) poderá ser uma forma de controlo de qualidade e segurança alimentar neste produto. Um pH máximo de 4,2 irá prevenir o crescimento da maioria das bactérias, patogénicas ou de deterioração dos alimentos. O limite inferior será determinado pela qualidade sensorial do produto, mas um pH próximo de 4,0 será um factor adicional de segurança alimentar. A recomendação mantém-se mesmo se se

optar por uma pasteurização do soro, dado que o pH baixo limita a sobrevivência de leveduras ao tratamento térmico. Um rácio entre o °Brix e a acidez titulável, ou °Brix e pH, poderá estar relacionado com a aceitação duma bebida à base de soro, o que poderá ser um estudo interessante a realizar no futuro.

Os resultados da evolução das fracções azotadas estudados permitem afirmar que a proteólise não é um factor de grandes alterações no produto nos tempos estudados. No entanto, há que ressaltar que não foi analisado o conteúdo vitamínico do soro e que este poderá sofrer alterações que podem ser significativas a nível de alegações nutricionais, mas que não são visíveis a nível de proteólise global. Nergiz e Seçkin (1998) constataram que 52% da tiamina (B1) e 60% da riboflavina (B2) do leite são perdidas no dessoramento, e pode-se esperar também a presença de vitamina C que é sensível à degradação por acção da luz.

A boa capacidade espumante demonstrada pelo soro em bruto abre possibilidades à sua utilização em bebidas como *smoothies* e batidos, em que a espuma é formada na altura do consumo com um curto tempo de vida. Já os resultados da capacidade emulsionante foram comparáveis aos de concentrados de proteínas de soro, hidrolisados de caseína ou hidrolisados de proteínas lácteas. Soros de leite gordo e magro têm propriedades distintas devido ao seu diferente conteúdo proteico, de lípidos e de fósforo, cálcio e ferro. A pasteurização aumenta as características espumantes e emulsionantes do soro de leite magro mas diminui as do gordo, devido ao pré-tratamento do leite no fabrico do iogurte.

Por tudo isto, a valorização de soro de leite deverá ser estudada caso a caso, isto é, para cada proveniência do soro, cada tratamento a que o soro é submetido, e cada destino considerado. É importante, pois, que pequenas e médias indústrias encontrem primeiramente um destino a dar ao seu subproduto, e só então adequem o tratamento a aplicar às características necessárias para o seu fim.

Para um pequeno produtor de iogurte concentrado, a melhor opção será sempre encontrar um parceiro que utilize o soro como matéria-prima e escoar o soro não processado dentro do seu tempo de vida útil, mas isto nem sempre é possível o que leva muitos produtores a entregar o seu soro a explorações pecuárias para utilização como bebida para animais.

No entanto, existem produtos à base de soro de iogurte que podem ser desenvolvidos por um pequeno produtor, tais como iogurtes líquidos, bebidas de fruta proteínadas, e sobremesas lácteas, e que podem ser uma oportunidade comercial.

Capítulo VI. Referências

- Ahmed, L., Martin-Diana, A. B., Rico, D., & Barry-Ryan, C. (2012). Quality and nutritional status of fresh-cut tomato as affected by spraying of delactosed whey permeate compared to industrial washing treatment. *Food and Bioprocess Technology*, 5(8), pp. 3103-3114.
- Akpınar-Bayızit, A., Özcan-Yılsay, T., & Yılmaz, L. (2007). Study on the use of yoghurt, whey, lactic acid and starter culture on carrot fermentation. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 57(2), pp. 147-150.
- Alvarenga, N. B. (2008). *Introdução da tecnologia de congelação na produção de queijo de ovelha*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa.
- AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis. Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs* (15 ed., Vol. I). Arlington, EUA: Association of Official Analytical Chemists.
- Athanasiadis, I., Boskou, D., Kanellaki, M., Kiosseoglou, V., & Koutinas, A. A. (2002). Whey liquid waste of the dairy industry as raw material for potable alcohol production by kefir granules. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(25), pp. 7231-7234.
- Aydin, F., & Çakmakçı, S. (2014). Possibilities for the use of whey in tel kadayıf (a Turkish dessert) production. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(2), pp. 250-257.
- Bielmann, V., Gillan, J., Perkins, N. R., Skidmore, A. L., Godden, S., & Leslie, K. E. (2010). An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 93(8), pp. 3713-3721.
- Branger, E. B., Sims, C. A., Schmidt, R. H., O'Keefe, S. F., & Cornell, J. A. (1999). Sensory characteristics of cottage cheese whey and grapefruit juice blends and changes during processing. *Journal of food science*, 64(1), pp. 180-184.
- Britten, M., & Giroux, H. J. (1991). Emulsifying properties of whey protein and casein composite blends. *Journal of Dairy Science*, 74(10), pp. 3318-3325.
- Bttco Overseas Pvt. Ltd. (s.d.). *Sorbitol 70%*. Obtido em 21 de Agosto de 2015, de <http://www.bttcogroup.in/sorbitol-70.html>
- Bullerman, L. B., & Berry, E. C. (1966). Use of Cheese Whey for Vitamin B12 Production I. Whey Solids and Yeast Extract Levels. *Applied microbiology*, 14(3), pp. 353-355.
- Bylund, G. (1995). *Dairy processing handbook*. Lund, Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB.
- Campbell, G. M., & Mougeot, E. (1999). Creation and characterisation of aerated food products. *Trends in Food Science & Technology*, 10(9), pp. 283-296.
- Castro-Cislaghi, F. P., Fritzen-Freire, C. B., & Sant'Anna, E. S. (2012). Potential of liquid whey as the encapsulating agent of Bifidobacterium Bb-12 by spray drying: comparison with arabic gum. *Ciência Rural*, 42(9), pp. 1694-1700.
- Cavalcante, A. V., Magalhães, N. A., Silva, G. M., Ronald, C., Wanderley, P., & Pessoa, K. D. (2014). Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* em reatores contendo sacarose a partir da fermentação de soro de queijo. *V Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental*. Belo Horizonte: MG.
- Chandan, R. C., & Kilara, A. (2013). *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks* (2nd ed.). Chichester, UK: Wiley-Blackwell.

- Compagno, C., Tura, A., Ranzi, B. M., & Martegani, E. (1993). Bioconversion of lactose/whey to fructose diphosphate with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnology and bioengineering*, 42(3), pp. 398-400.
- De Cássia da Fonseca, V., Haminiuk, C. W., Izydoro, D. R., Waszczynskyj, N., De Paula Scheer, A., & Sierakowski, M. R. (2009). Stability and rheological behaviour of salad dressing obtained with whey and different combinations of stabilizers. *International journal of food science & technology*, 44(4), pp. 777-783.
- De Wit, J. N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, 81(3), pp. 597-608.
- De Wit, J. N., & Klarenbeek, G. (1984). Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67(11), pp. 2701-2710.
- DEFRA, FSA. (2011). *Guidance on the application of date labels to food*. Reino Unido: Department for Environment, Food and Rural Affairs; Food Standards Agency (UK).
- Dermiki, M., Ntzimani, A., Badeka, A., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2008). Shelf-life extension and quality attributes of the whey cheese "Myzithra Kalathaki" using modified atmosphere packaging. *LWT-Food Science and Technology*, 41(2), pp. 284-294.
- Dissanayake, M., & Vasiljevic, T. (2009). Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. *Journal of Dairy Science*, 92(4), pp. 1387-1397.
- Domingues, L., Lima, N., & Teixeira, J. A. (1999). Novas metodologias para a fermentação alcoólica do soro de queijo. *Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente*. Lisboa: Centro de Engenharia Biológica – IBQF, Universidade do Minho.
- Elias, F. O., Capitani, C., Molina, S., Añon, M., & Pacheco, M. (2006). Propriedades emulsificantes de complexos de proteínas de soro de leite com polissacarídeos. *Brazilian Journal of Food Technology*, III JIPCA, pp. 75-80.
- FAO. (2015). *FAOSTAT Metadata / Production*. Obtido em 5 de Setembro de 2015, de FAOSTAT: <http://faostat3.fao.org>
- Fassio, L. D., Téran-Ortiz, G. P., Araújo, R., & Mendonça, A. (2009). Caracterização sensorial e físico-química de gelados comestíveis a base de soro de leite adicionado de polpas de frutos do cerrado. *II Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG campus Bambuí*. Bambuí: Instituto Federal Minas Gerais.
- Foegeding, E. A., & Davis, J. P. (2011). Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocolloids*, 25(8), pp. 1853-1864.
- Gallardo-Escamilla, F. J., Kelly, A. L., & Delahunty, C. M. (2005). Sensory characteristics and related volatile flavor compound profiles of different types of whey. *Journal of dairy science*, 88(8), pp. 2689-2699.
- Gallardo-Escamilla, F. J., Kelly, A. L., & Delahunty, C. M. (2007). Mouthfeel and flavour of fermented whey with added hydrocolloids. *International Dairy Journal*, 17(4), pp. 308-315.
- Gao, A., Mutharia, L., Chen, S., Rahn, K., & Odumeru, J. (2002). Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Journal of Dairy Science*, 85(12), pp. 3198-3205.
- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, 45(4), pp. 473-483.
- Haraguchi, F. K., Abreu, W. C., & Paula, H. D. (2006). Whey protein: composition, nutritional properties, applications in sports and benefits for human health. *Revista de nutrição*, 19(4), pp. 479-488.
- Harwalkar, V. R. (1980). Kinetics of thermal denaturation of β -lactoglobulin at pH 2.5. *Journal of dairy science*, 63(7), pp. 1052-1057.

- Harwalker, V. R. (1979). Comparison of physicochemical properties of different thermally denatured whey proteins. *Milchwissenschaft*, 34, pp. 419-422.
- Hekmat, S., & McMahon, D. J. (1998). Distribution of iron between caseins and whey proteins in acidified milk. *LWT-Food Science and Technology*, 31(7), pp. 632-638.
- Hernández, A., & Harte, F. M. (2009). Isolation of caseins from whey proteins by microfiltration modifying the mineral balance in skim milk. *Journal of dairy science*, 92(11), pp. 5357-5362.
- Hobman, P. G. (1984). Review of processes and products for utilization of lactose in deproteinated milk serum. *Journal of Dairy Science*, 67(11), pp. 2630-2653.
- Holsinger, V. H., Posati, L. P., & DeVilbiss, E. D. (1974). Whey beverages: A review. *Journal of dairy science*, 57(8), pp. 849-859.
- Horax, R., Hettiarachchy, N., Kannan, A., & Chen, P. (2011). Protein extraction optimisation, characterisation, and functionalities of protein isolate from bitter melon (*Momordica charantia*) seed. *Food Chemistry*, 124, pp. 545-550.
- INE. (2015). *Dados Estatísticos*. Obtido em 5 de Junho de 2015, de Instituto Nacional de Estatística: <https://www.ine.pt>
- INSA. (2015). *Tabela da Composição de Alimentos*. Obtido em 21 de Setembro de 2015, de Instituto Doutor Ricardo Jorge: <http://www.insa.pt>
- ISO 4833-1. (2013). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30 °C*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO 6611:2004; IDF 94. (2004). *Milk and milk products – Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds – Colony-count technique at 25 °C*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO 6887-1. (1999). *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1. General rules for the preparation of the initial suspension and decimal solutions*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO 7889:2003; IDF 117. (2003). *Yogurt – Enumeration of Characteristic Microorganisms – Colony-count Technique at 37 °C*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO 8199. (2005). *Water quality – General guide to the enumeration of microorganisms by culture*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Jaros, D., Petrag, J., Rohm, H., & Ulberth, F. (2001). Milk fat composition affects mechanical and rheological properties of processed cheese. *Applied Rheology*, 11, pp. 19-25.
- Jayasena, V., & Cameron, I. (2008). ° Brix/acid ratio as a predictor of consumer acceptability of Crimson Seedless table grapes. *Journal of Food Quality*, 31(6), pp. 736-750.
- Jeličić, I., Božanić, R., & Tratnik, L. (2008). Whey-based beverages-a new generation of dairy products. *Mljekarstvo*, 58(3), pp. 257-274.
- Ji, T., & Haque, Z. U. (2003). Cheddar whey processing and source: I. Effect on composition and functional properties of whey protein concentrates. *International journal of food science & technology*, 38, pp. 453-461.
- Jiao, B., Cassano, A., & Drioli, E. (2004). Recent advances on membrane processes for the concentration of fruit juices: a review. *Journal of Food Engineering*, 63(3), pp. 303-324.
- Johansen, A. G., Vegarud, G. E., & Skeie, S. (2002). Seasonal and regional variation in the composition of whey from Norwegian Cheddar-type and Dutch-type cheeses. *International Dairy Journal*, pp. 621-629.

- Johnson, B. R. (2008). *Whey protein concentrates in low-fat application*. Arlington: US Dairy Export Council.
- Kar, T., & Misra, A. K. (1999). Therapeutic properties of whey used as fermented drink. *Revista de microbiologia*, 30(2), pp. 163-169.
- Khare, A., Choudhary, P. L., Goel, B. K., & Shrivastava, A. (2009). Studies on physico-chemical and sensory characteristics of whey based watermelon beverage. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 2(1), pp. 57-59.
- Köksoy, A., & Kılıç, M. (2003). Effects of water and salt level on rheological properties of ayran, a Turkish yoghurt drink. *International Dairy Journal*, 13(10), pp. 835-839.
- Kosikowski, F. V. (1979). Whey utilization and whey powders. *Dairy Science*, 62(7), pp. 1149-1160.
- Kuchroo, C. N., & Fox, P. F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*, 37, pp. 331-335.
- Lucey, J. A., & Singh, H. (1997). Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food research international*, 30(7), pp. 529-542.
- Madrona, G. S., Zotarelli, M. F., & Bergamasco, R. (2008). Estudo do efeito da adição de soro de queijo na qualidade microbiológica do doce de leite pastoso. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 2(1).
- Martin-Diana, A. B., Rico, D., Frias, J., Mulcahy, J., Henehan, G. T., & Barry-Ryan, C. (2006). Whey permeate as a bio-preservative for shelf life maintenance of fresh-cut vegetables. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(1), pp. 112-123.
- Mawson, A. J. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology*, 47(3), pp. 195-203.
- McSweeney, P. L. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), pp. 127-144.
- McSweeney, P. L., & Fox, P. F. (1997). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Le Lait*, 77 (1), pp. 41-76.
- Mehaia, M., & Cheryan, M. (1986). Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle bioreactor. *Enzyme and microbial technology*, 8(5), pp. 289-292.
- Michalski, M. C., Cariou, R., Michel, F., & Garnier, C. (2002). Native vs. damaged milk fat globules: membrane properties affect the viscoelasticity of milk gels. *Journal of Dairy Science*, 85(10), pp. 2451-2461.
- Monsoor, M. A., Farooq, K., & Haque, Z. U. (2003). Cottage cheese whey as an ingredient of Cottage cheese dressing mixes. *International journal of dairy technology*, 56(1), pp. 17-21.
- Moreira, S. R., Schwan, R. F., Carvalho, E. P., & Wheals, A. E. (2001). Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(2), pp. 117-122.
- Morr, C. V. (1992). Whey utilization. In J. G. Zadov, *Whey and lactose processing* (pp. 133-155). Netherlands: Springer.
- Mukhopadhyay, R., Chatterjee, S., Chatterjee, B. P., Banerjee, P. C., & Guha, A. K. (2005). Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. *International Dairy Journal*, 15(3), pp. 299-303.
- Mulvihill, D., & Donovan, M. (1987). Whey proteins and their thermal denaturation-a review. *Irish Journal of Food Science and Technology*, pp. 43-75.
- Murari, C. S. (2013). *Estudo da bioconversão da lactose do soro de leite em bioetanol pela levedura Kluyveromyces marxianus*. Dissertação para obtenção do grau de Mestrado. São Pulo:

- Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.
- Nergiz, C., & Seçkin, A. K. (1998). The losses of nutrients during the production of strained (Torba) yoghurt. *Food chemistry*, *61*(1), pp. 13-16.
- Nogueira, C., Albano, H., Gibbs, P., & Teixeira, P. (1998). Microbiological quality of Portuguese yogurts. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *21*(1), pp. 19-21.
- NP 1829. (1982). *Microbiologia Alimentar. Preparação da amostra para análise microbiológica*. Monte da Caparica, Portugal: Instituto Português da Qualidade.
- NP 675. (1986). *Leites e Leites em Pó - Determinação do teor de lactose*. Monte da Caparica, Portugal: Instituto Português da Qualidade.
- Nykänen, A., Lapveteläinen, A., Kallio, H., & Salminen, S. (1998). Effects of whey, whey-derived lactic acid and sodium lactate on the surface microbial counts of rainbow trout packed in vacuum pouches. *LWT-Food Science and Technology*, *31*(4), pp. 361-365.
- Oliveira, F. A. (2011). *Desenvolvimento de bebida láctea não fermentada com soro de leite ácido. Trabalho de graduação, Curso Superior de Tecnologia em Alimentos*. Francisco Beltrão: Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Francisco Beltrão.
- Pagno, C. H., Baldasso, C., Tessaro, I. C., Flores, S. H., & Jong, E. (2009). Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, *20*(2), pp. 231-239.
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, *105*(1), pp. 1-14.
- Papaioannou, G., Chouliara, I., Karatapanis, A. E., Kontominas, M. G., & Savvaidis, I. N. (2007). Shelf-life of a Greek whey cheese under modified atmosphere packaging. *International Dairy Journal*, *17*(4), pp. 358-364.
- Parrondo, J., Herrero, M., García, L. A., & Díaz, M. (2003). A Note — Production of Vinegar from Whey. *Journal of the Institute of Brewing*, *109*(4), pp. 356-358.
- Patel, H., Patel, S., Beausire, R., & Agarwal, S. (2015). *Understanding the Role of Dairy Proteins in Ingredient and Product Performance*. U.S. Dairy Export Council.
- Patel, M. T., & Kilara, A. (1990). Studies on whey protein concentrates. 2. Foaming and emulsifying properties and their relationships with physicochemical properties. *Journal of Dairy Science*, *73*(10), pp. 2731-2740.
- Pescuma, M., Hébert, E. M., Mozzi, F., & de Valdez, G. (2008). Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food microbiology*, *25*(3), pp. 442-451.
- Poole, S., West, S. I., & Walters, C. L. (1984). Protein–protein interactions: their importance in the foaming of heterogeneous protein systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *35*(6), pp. 701-711.
- Portaria nº 742/92. (24 de Julho de 1992). Estabelece regras sobre a produção, comercialização e consumo de iogurte e de leites fermentados. *Diário da República nº 169 – I Série*, 3462-3465.
- Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão. (15 de Novembro de 2005). relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios (Texto relevante para efeitos do EEE). *Jornal Oficial da União Europeia*, p. L 338/1.
- Regulamento (UE) N. 1169/2011. (25 de Outubro de 2011). do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n. o 1924/2006 e (CE) n. o 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*(Revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão,

- 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n. o 608/2004 da Comissão), p. L 304/18.
- Rico, D., Martin-Diana, A. B., Barat, J. M., & Barry-Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18(7), pp. 373-386.
- Robertson, G. L. (2009). *Food packaging and shelf life: a practical guide*. New York, Boca Raton: CRC Press.
- Rocha, L. O. (2009). *Elaboração de doce de leite com café e soro de queijo. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Alimentos*. Lavras: Universidade Federal de Lavras.
- Ryder, D. N. (1980). Economic considerations of whey processing. *International Journal of Dairy Technology*, 33(2), pp. 73-77.
- Sanmartín, B., Díaz, O., Rodríguez-Turienzo, L., & Cobos, A. (2012). Composition of caprine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese whey. *Small Ruminant Research*, pp. 186-192.
- Santos, M. I., Martins, S. R., Pedroso, L., Sousa, I., & Ferreira, M. A. (2015). Potential bio-activity of whey fermented extract as sanitizer of organic grown lettuce. *Food Control*, 50, pp. 477-481.
- Schmidt, R. H., Packard, V. S., & Morris, H. A. (1984). Effect of processing on whey protein functionality. *Journal of Dairy Science*, 67(11), pp. 2723-2733.
- Shon, J., & Haque, Z. U. (2007). Efficacy of sour whey as a shelf-life enhancer: use in antioxidative edible coatings of cut vegetables and fruit. *Journal of Food Quality*, 30(5), pp. 581-593.
- Silva, M. L. (2000). *Estudo da maturação em queijo São Jorge – caracterização do perfil proteolítico. Dissertação para a obtenção do grau de Doutoramento*. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.
- Siso, M. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 57(1), pp. 1-11.
- Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—from ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal*, 18(7), pp. 695-704.
- Soares, C. P. (2013). *Influência da redução de sal nas propriedades do queijo de São João da ilha do Pico*. Monte da Caparica: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Souza Soares, D., Montenegro, L., & Stamford, T. (2008). *Desenvolvimento de formulação para produção de iogurte à base de soro de leite. Dissertação para obtenção do grau de Mestrado*. Recife: Universidade Federal de Pernambuco.
- Souza, T. A. (2009). *Inversão de emulsões de petróleo usando partículas sólidas*. Curitiba: Universidade Federal do Paraná – UFPR.
- Soydemir, E. (2008). *Determination of whey-based medium requirements and growth characteristics for the production of yoghurt starter cultures*. İzmir: Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology.
- Srikantia, S. G. (1981). *The use of biological value of a protein in evaluating its quality for human requirements*. Rome: Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Energy and Protein Requirements.
- Steele, R. (2004). *Understanding and Measuring the Shelf-life of Food*. Boca Raton, Boston, New York, Washington: CRC Press.
- Tamime, A. Y. (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications - a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, pp. S2-S15.

- Tamime, A. Y. (2006). *Fermented milks*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Tamime, A. Y., Kalab, M., Muir, D. D., & Barrantes, E. (1995). The microstructure of set-style, natural yogurt made by substituting microparticulate whey protein for milk fat. *International Journal of Dairy Technology*, 48(4), pp. 107-111.
- Teixeira, P., Castro, H., & Kirby, R. (1994). Inducible thermotolerance in *Lactobacillus bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology*, 18(4), pp. 218-221.
- Tong, L. M., Sasaki, S., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. *Journal of Food Science*, 65(8), pp. 1325-1329.
- Tsakali, E., Petrotos, K., D'Allessandro, A., & Goulas, P. (2010). A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. *6th International Conference on Simulation and Modelling in the Food and Bio-Industry (FOODSIM 2010)*. Braganca, Portugal: CIMO.
- Tuckett, H. M., Nichol, A. W., & Harden, T. J. (1996). Production of pickling vinegar from acid whey. *Australian journal of dairy technology*, 51(1), pp. 53-57.
- Vandecasteele, C., & Block, C. B. (1993). *Modern Methods for Trace Element Determination*. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons.
- Viljoen, B. C. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1), pp. 37-44.
- Wang, G., & Wang, T. (2009). Improving Foaming Properties of Yolk-Contaminated Egg Albumen by Basic Soy Protein. *Journal of Food Science*, 74 (8), pp. 581-587.
- Watanabe, F. S., & Olsen, S. R. (1965). Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from the soil. *Soil Science Society of America Journal*, 29(6), pp. 677-678.
- Watts, S., & Halliwell, L. (1996). Appendix 3 – Detailed field and chemical methods for soil. In S. Watts, & L. Halliwell, *Essential Environmental Science, Methods & Techniques* (pp. 475-505). Routledge, Londres, Reino Unido.
- Yamauchi, K., Shimizu, M., & Kamiya, T. (1980). Emulsifying properties of whey protein. *Journal of food science*, 45(5), pp. 1237-1242.
- Yonest. (2015). Obtido em 12 de Agosto de 2015, de <http://www.yonest.pt>
- Yoon, K. Y., Woodams, E. E., & Hang, Y. D. (2006). Relationship of acid phosphatase activity and Brix/acid ratio in cherries. *LWT-Food Science and Technology*, 39(3), pp. 316-320.
- Young, S. L., Sarda, X., & Rosenberg, M. (1993). Microencapsulating properties of whey proteins. 1. Microencapsulation of anhydrous milk fat. *Journal of Dairy Science*, 76(10), pp. 2868-2877.
- Yvon, M., Chabanet, C., & Pélissier, J. P. (1989). Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions hypothesis on the precipitation mechanism. *International journal of peptide and protein research*, 34(3), pp. 166-176.
- Zall, R. R. (1992). Sources and composition of whey and permeate. In *Whey and lactose processing* (pp. 1-72). Netherlands: Springer.
- Zoellner, S., Cruz, A., Faria, J., Bolini, H., Moura, M., Carvalho, L., et al. (2009). Whey beverage with acai pulp as a food carrier of probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 64(2), p. 177.