

Formulação de uma bebida à base de soro de leite com péptidos bioativos

Ricardo Miguel dos Santos Miranda

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador(es): Prof^a Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo
Doutora Ana Isabel Gusmão Lima

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, orientadora;

Doutora Maria Cristiana Henriques Nunes, Professora Auxiliar do(a) Faculdade de Engenharia da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

“O conhecimento une cada um consigo mesmo e todos com todos” –

José Saramago (1922 – 2010)

Agradecimentos

Aproveito este espaço para dedicar esta dissertação a todas as pessoas que influenciaram direta e indiretamente a sua construção.

Ao *Disease & Stress Biology Group* e ao Grupo de Engenharia Alimentar pelo espírito de abertura e disponibilidade de realizar esta atividade de pesquisa e desenvolvimento.

À Prof^a Anabela Raymundo que me auxiliou a traçar um rumo definitivo; pelo apoio, incentivo, discussão de ideias e críticas construtivas que foram os alicerces deste trabalho.

À Doutora Ana Lima pela ajuda na apresentação dos resultados, na concretização da parte da bioatividade do soro, esclarecimento de dúvidas e acompanhamento laboratorial imprescindível.

À Prof^a Adélia Ferreira e ao Prof. Ricardo Boavida Ferreira, pelas valiosas trocas de ideias, trabalhos desenvolvidos nas áreas de Microbiologia e Bioquímica e fornecimento de material de pesquisa.

À Doutora Isabel Santos pela ajuda na apresentação de resultados e bibliografia, pelo espírito de abertura e disponibilidade em esclarecer dúvidas.

À Prof^a Catarina Prista e à empresa Cooking.LAB[®], respetivamente pelo auxílio na etapa de desenvolvimento e concretização do produto final e pela disponibilização de ingredientes e de aromas.

Aos colegas de laboratório: Joana, Patrícia, Carla, Christine, Daniel, Luís e à Diana pelas explicações prestadas no decorrer de todas as atividades e aos quais, sem a respetiva ajuda, o trabalho teria ficado aquém das minhas expectativas. Aos amigos: Rodrigo (pela ajuda imensurável ao longo deste ciclo), ao Pedro, à Catarina e à Rita.

Expresso também os meus agradecimentos pela empresa fornecedora do soro de leite, pela receção calorosa na unidade industrial e pelos votos de bom trabalho que aqui quero fazer justiça.

E por fim, aos meus pais, pelo apoio incondicional e por sempre estarem lá para garantir que fazia um bom trabalho; que me ofereceram esta oportunidade que jurei nunca “ficar à margem”. A todos, os meus sinceros agradecimentos por esta experiência enriquecedora e plural.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma bebida à base de soro fermentado, com péptidos bioativos, sendo esta categorizada como um produto com potencial bioativo para a saúde humana. O potencial bioativo da bebida traduz-se numa redução da atividade de enzimas associadas a inflamações no cólon, inflamações estas que são mediadas por duas gelatinases (a MMP-2 e a MMP-9). Esta bebida poderia ser uma alternativa a diversos preparados, por exemplo a partir de soja ou arroz. Apresentaria a vantagem de reutilizar um subproduto da indústria do queijo, baseando-se numa abordagem na ótica da economia circular.

Foi avaliada a capacidade do soro de leite fermentado na inibição da atividade das gelatinases, através de ensaios fluorimétricos e ensaios de migração celular. Efetuou-se igualmente a caracterização centesimal do soro de leite e ensaios reológicos das bebidas desenvolvidas. Prepararam-se bebidas com adição de polpa de fruta, sendo que estas revelaram um desempenho sensorial pobre. Em alternativa, utilizaram-se farinhas pouco convencionais no fabrico de bebidas (alfarroba e bolota).

As bebidas de farinhas às quais foram adicionados aromas, revelaram ser a melhor formulação por manterem uma capacidade anti-inflamatória e pela avaliação “muito positiva” em painel sensorial de discussão. Destas, as bebidas com alfarroba revelaram melhor aptidão sensorial. Nos ensaios de migração celular e ensaios fluorimétricos, existiram diferenças significativas na inibição das gelatinases, que corroboram o papel bioativo do soro. Em termos da concentração mínima inibitória, a bebida de bolota apresenta maior potencial inibidor de crescimento celular ($11,89 \mu\text{g.mL}^{-1}$) face ao da bebida de alfarroba ($20,91 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Em termos reológicos, as bebidas finais revelaram comportamento reofluidificante semelhante a bebidas de mercado (e.g. quefir e iogurte líquido).

A aposta em produtos fermentados de soro revela-se promissora, dado os potenciais benefícios para a saúde humana.

Palavras-chave: Soro de leite, bebida, péptido, alfarroba, bolota.

Abstract

The main objective of this assignment was the development of a fermented whey-based beverage with bioactive peptides, acting as a functional product with benefits to human health. This bioactive potential would play a role in lowering the activity of enzymes associated with colon inflammations that are mediated by two gelatinases (MMP-2 and MMP-9). This beverage could act as an alternative to different mixes, like the ones made from soy or rice. The same beverage would also have the added advantage of reusing a by-product of the cheese industry, based on a circular economy approach.

The capacity of fermented whey in inhibiting gelatinase activity was assessed through fluorimetric assays and cell migration assays. In another stage, a centesimal analysis of whey and rheological assays of the developed beverages were prepared. Beverages with the addition of fruit pulp were made, but these revealed a poor sensorial evaluation. As an alternative, two kinds of unconventional flours were used in the development of these whey-based beverages (carob and acorn).

Flour-based beverages with added aromas revealed to have the best capacity for maintaining an anti-inflammatory effect and due to its “very positive” mark in a sensorial panel with discussion. Of these, the beverages with carob revealed the best sensorial prowess. In the cell migration assays and fluorimetric assays, there were significant differences in the inhibition of gelatinases, which corroborate whey’s bioactive role. In terms of its minimal inhibitory concentration, the acorn flour beverage presented a bigger inhibitory potential ($11,89 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) when compared to the carob flour beverage ($20,91 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). In rheological terms, the final beverages revealed a shear-thinning behavior which were similar to purchasable ones (e.g. kefir and liquid yogurts).

Fermented whey products have revealed to be a promising bet in terms of its potential to the food industry.

Key words: Whey, beverage, peptide, carob, acorn.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice Geral.....	iv
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
1. Introdução	1
1.1. Leite	3
1.1.1. Leite: definição, benefícios e problemas associados.....	3
1.1.2. Alergias e intolerâncias ao leite	5
1.1.3. Bebidas vegetais alternativas ao leite de vaca.....	6
1.2. Queijo.....	7
1.2.1. Queijo: definição, indústria e impacto ambiental	7
1.2.2. Economia circular na produção de queijo	10
1.3. Soro de leite	12
1.3.1. Definição e história	12
1.3.2. Comercialização	13
1.3.3. Caracterização nutricional.....	15
1.3.4. Proteínas do soro de leite	17
1.3.5. O soro como alternativa viável ao leite.....	18
1.3.6. O soro de leite fermentado como potencial inibidor de inflamações.....	19
1.3.7. Bioatividade dos péptidos resultantes da fermentação presentes no soro	20
1.3.8. O soro como alternativa ao leite: perspetivas de mercado.....	22
1.4. Formulação de bebidas de soro de leite	23
1.4.1. Soro de leite no enriquecimento nutricional de bebidas	23
1.4.2. Farinhas pouco exploradas para a produção de bebidas.....	24
Farinha de alfarroba (<i>Ceratonia siliqua</i> L.).....	25
Farinha de bolota de azinheira (<i>Quercus ilex</i> L.).....	25
1.4.3. Papel de espessantes: goma xantana	27
1.4.4. Processos de concentração utilizados na produção de uma bebida	28
1.4.5. Reologia no desenvolvimento de produtos alimentares	30
Fluidos newtonianos e não newtonianos	31
Modelos reológicos para determinação da viscosidade	33

Objetivos	35
2. Materiais e Métodos	37
2.1. Materiais	37
2.1.1. Caracterização do soro utilizado	37
2.1.2. Materiais utilizados na formulação da bebida.....	37
2.1.3. Polpas de fruta.....	38
2.1.4. Farinha de alfarroba e farinha de bolota	38
2.2. Métodos.....	39
I - Ensaio preliminar para preparar soro com otimização de bioatividade	40
Quantificação de proteína (Método de Bradford).....	40
Análise do perfil proteico por SDS-PAGE.....	40
Ensaio fluorimétrico <i>DQ-Gelatin</i>	41
II – Preparação da bebida.....	42
Preparação da bebida de SL com adição de polpas de fruta congeladas.....	42
Preparação da bebida de SL com adição de farinhas pouco exploradas.....	43
Ensaio físico-químicos.....	44
Extrato seco total	44
Cinza.....	45
Acidez	45
pH.....	45
Avaliação de viscosidade	45
Desenho experimental	45
III – Validação do potencial bioativo do soro e da bebida final	46
Análise da capacidade de inibição de invasão tumoral.....	46
Manutenção das células HT29	46
Ensaio de proliferação celular	47
IV - Tratamento estatístico	47
3. Resultados e Discussão	48
I – Ensaio preliminar para preparar soro com otimização de bioatividade.....	48
Análise do perfil proteico (SDS-PAGE).....	48
Inibição da capacidade de invasão tumoral.....	50
Inibição da atividade das gelatinases (MMP-9 e MMP-2)	51
Ensaio fluorimétrico <i>DQ-Gelatin</i>	51
II – Preparação da bebida.....	52
Concentração do soro de leite por <i>spray drying</i> e liofilização	52

Caracterização das matérias-primas adicionadas à bebida.....	53
Formulação das bebidas de SL.....	55
Caracterização reológica das bebidas de fruta.....	56
Formulação das bebidas com farinha de alfarroba e farinha de bolota.....	58
Caracterização reológica das bebidas de farinha.....	59
Formulação final.....	65
Aromatização.....	65
Avaliação sensorial com painel de discussão.....	66
III – Validação do potencial bioativo do soro e da bebida final.....	66
Análise da capacidade de inibição de invasão tumoral.....	67
Ensaio de migração celular das bebidas de SL com farinhas.....	67
Ensaio de proliferação celular.....	68
4. Conclusão.....	70
5. Referências bibliográficas.....	72

Índice de Figuras

Figura 1. Pirâmide dos Alimentos como se encontra definida pelo Departamento de Nutrição da <i>Harvard School of Public Health</i> (2016).....	4
Figura 2. Evolução nacional do consumo de leite e produtos lácteos (por kg/hab.ano ⁻¹) (de iogurte, queijo e manteiga) no período de 1980 a 2015.....	5
Figura 3. Diagrama genérico de fabrico de queijo de grau variável de maturação.....	8
Figura 4. Balanço mundial da utilização do soro de leite.	8
Figura 5. Etapas de transformação do soro de leite desde a sua produção, até ao fabrico de requeijão.	9
Figura 6. Representação esquemática generalizada do conceito de economia circular adaptada em termos de indústrias alimentares.	11
Figura 7. Projeção mundial de produção de queijo para o período de 2016 a 2025 (em milhares de toneladas)	14
Figura 8. Comparação da concentração em aminoácidos essenciais do soro de leite (mg.g ⁻¹) (em leucina e valina) em diferentes alimentos.....	16
Figura 9. Estrutura da MMP-2 e MMP-9 dependente do subgrupo.....	20
Figura 10. Representação esquemática das funções das gelatinases de matriz (em específico a MMP-9).....	20
Figura 11. Estrutura molecular da goma xantana.....	27
Figura 12. Esquema geral de obtenção de concentrados via <i>spray drying</i>	29
Figura 13. Exemplo ilustrativo do mecanismo de funcionamento da liofilização	30
Figura 14. Comparação das curvas de escoamento de fluidos em relação ao aumento da velocidade de deformação ($\dot{\gamma}$).....	32
Figura 15. Comportamento reofluidificante de acordo com a respetiva velocidade de deformação aplicada.	33
Figura 16. Representações do Modelo de Cross, do Modelo da Lei da Potência (também denominado Ostwald-de Waele) e do Modelo de Sisko.....	34
Figura 17. Fluxograma representativo das etapas de preparação das bebidas de abacaxi (BABA), morango (BMOR) e papaia (BPAP).....	43
Figura 18. Fluxograma representativo das etapas de preparação das bebidas de alfarroba (BALF) e de bolota (BBOL).	44

Figura 19. Perfil polipeptídico das frações proteicas de amostras de soro de leite de mistura obtido por SDS-PAGE, em gel de poli-acrilamida (15 % m/v acrilamida), suplementado com 10 % (v/v) glicerol.....	49
Figura 20. Perfil polipeptídico obtido por SDS-PAGE (17,5% m/v acrilamida; suplementado com 10% (v/v) glicerol).....	49
Figura 21. Exemplos representativos de ensaios de migração celular. Respetivamente, da esquerda para a direita: amostra de soro não fermentado (SNF), soro fermentado seis dias (SF), soro concentrado (SFC) e soro fermentado e fervido após terem sido colocados 100 µg de soro de leite de vaca, ovelha e cabra.	50
Figura 22. Percentagem de invasão celular, em relação ao controlo (dado por 100 %), ou seja, fecho completo do corte de células HT29 (n = 9).	51
Figura 23. Inibição da atividade gelatinolítica das MMPs (MMP-2 e MMP-9) na presença das amostras de SNF (soro não fermentado), SF (soro fermentado), SF (soro concentrado) e SFF (soro fermentado e fervido)..	52
Figura 24. Exemplo de produto acabado. Amostras de bebida de soro de leite com polpa de fruta congelada: de morango (esquerda) e de abacaxi (direita).....	56
Figura 25. Curvas de viscosidade relativas à bebida de morango (laranja) e bebida de papaia (verde). Em comparação apresenta-se um produto comercial (néctar de pera) (preto).	57
Figura 26. Curvas de viscosidade de bebidas de soro de leite com incorporação de farinha de alfarroba ou de bolota, com e sem tratamento térmico a 90°C durante 5 minutos.	59
Figura 27. Consistência (K) (Pa.s ⁿ) do ensaio das bebidas (5°C) em sala climatizada a 20°C de soro de leite com farinhas de alfarroba (BALF), bolota (BBOL), comparação com os tratamentos térmicos efetuados e comparação com bebidas comerciais..	61
Figura 28. Variação do índice de consistência (K) com a concentração de farinha de alfarroba e de bolota.	62
Figura 29. Variação do índice de consistência (K) das bebidas de soro de leite com incorporação de 7,5% (m/m) de farinha de alfarroba e de farinha de bolota com diferentes teores de goma xantana.....	64
Figura 30. Exemplos representativos de ensaios de migração celular (na fração de soro fermentado seis dias e concentrado, bebida de soro de leite com alfarroba (BALF) e bebida de soro de leite com bolota (BBOL) após terem sido colocados 100 µg de amostras de soro de leite de vaca, ovelha e cabra.	67
Figura 31. Percentagem de invasão celular, em relação ao controlo (dado por 100 %), ou seja, fecho completo do corte de células HT29 (n = 9).....	68

Índice de Tabelas

Tabela 1. Composição média aproximada de soro de leite ácido e soro de leite doce resultantes do fabrico de queijo.....	15
Tabela 2. Perfil proteico do soro de leite, respetiva concentração e massa molecular	17
Tabela 3. Papel bioativo de péptidos derivados de leite (provenientes de várias espécies de mamíferos) no organismo humano.....	21
Tabela 4. Exemplos de péptidos bioativos derivados do soro de leite.	22
Tabela 5. Listagem de algumas frações proteicas do leite e respetiva percentagem de indivíduos com alergias.....	22
Tabela 6. Declaração nutricional média por 100 g de polpa de abacaxi.	38
Tabela 7. Declaração nutricional média por 100 g de farinha de alfarroba biológica.	39
Tabela 8. Quantificação dos ingredientes utilizados em diferentes formulações com 7,5 % de farinha de alfarroba e 7,5 % de farinha de bolota.	46
Tabela 9. Parâmetros que melhor caracterizam o soro de leite fermentado e concentrado e as polpas congeladas.	54
Tabela 10. Variação de pH ao longo do tempo de armazenamento e respetiva temperatura de conservação (5°C durante 1 mês)..	55
Tabela 11. Índice de escoamento (n) e índice de consistência (K) para as bebidas de morango (BMOR) e papaia (BPAP).....	58
Tabela 12. Índice de consistência (K) e de escoamento (n) para as bebidas soro de leite com incorporação de farinha de alfarroba ou de bolota, com e sem tratamento térmico.	60
Tabela 13. Ensaio referentes à bebida de SL com farinha de alfarroba (BALF) e BBOL (parâmetros da aproximação à equação de Cross	63
Tabela 14. Representação de aromas utilizados na seleção das bebidas de SL com 7,5 % (m/m) de farinha de alfarroba e farinha de bolota.....	66
Tabela 15. Concentração mínima inibitória (CMI) das bebidas de soro de leite com farinhas pouco exploradas (BALF e BBOL) e do soro de leite isolado ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).	69

Lista de Abreviaturas

ACE - *Angiotensin-converting enzyme* (Enzima conversora de angiotensina)

ALA - α -Lactalbumina

BABA - Bebida de Abacaxi

BALF - Bebida de Alfarroba

BBOL - Bebida de Bolota

BLG - β -Lactoglobulina

BMOR - Bebida de Morango

BPAP - Bebida de Papaia

CBO₅ - Carência Biológica de Oxigénio (ao fim de 5 dias)

CQO - Carência Química de Oxigénio

DQ-Gelatin - *Dye-Quenched™ Gelatin* (Gelatina DQ)

ETARI - Estação de Tratamento de Águas Residuais e Industriais

FAO - *Food and Agriculture Organization* (Organização para a Agricultura e Alimentação)

FENALAC - Federação Nacional das Cooperativas de Produtores de Leite

g - Unidade de força gravitacional

HWP - *Hydrolysed Whey Protein* (Proteína hidrolisada de soro de leite)

K - Índice de consistência

kDa - kilo Dalton

LAB - *Lactic Acid Bacteria* (Bactérias produtoras de ácido láctico)

MIC - *Minimal Inhibitory Concentration* (Concentração Mínima Inibitória)

MMP - Metaloproteinases de Matriz

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

n – Índice de escoamento (este “n” não é aplicável ao modelo de Cross)

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino)

pH - *Potential of Hydrogen* (Potencial de Hidrogénio)

PSA - Persulfato de Amónia

PUFA - *Poliunsaturated Fatty Acids* (Ácidos gordos polinsaturados)

rpm - Rotações por Minuto

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Medium* (Meio Roswell Park Memorial Institute)

SBR - *Sample Buffer Reducing* (Tampão redutor de tratamento de amostra)

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida)

SF - Soro de Leite Fermentado

SFC - Soro de Leite Fermentado e Concentrado

SFF - Soro de Leite Fermentado e Fervido

SL - Soro de Leite (de vaca, cabra e ovelha)

SNF - Soro de Leite Não Fermentado

t - Tonelada

TCA - *Trichloroacetic acid* (Ácido tricloroacético)

TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

UF - Ultrafiltração

WPC - *Whey Protein Concentrate* (Concentrado de proteína de soro)

WPI - *Whey Protein Isolate* (Concentrado de proteína de soro isolada)

XANT - Goma xantana

Notas:

1. No capítulo “2. Materiais e Métodos” (e subsequentes) todas as referências a soro de leite dadas na presente dissertação referem-se a SL da mesma proveniência.

2. Todas as referências às bebidas formuladas, no decorrer da presente dissertação, apresentam soro de leite fermentado, submetido a liofilização e ressuspendido num volume cinco vezes menor (designado por SFC) .

1. Introdução

Desde a domesticação de pequenos ruminantes (8000 a.C.) na Ásia Menor (Bellwood, 2005) que o consumo de leite tem exercido uma forte presença na vida das populações, sendo explicado pelos benefícios que se extraem do respetivo valor nutricional elevado. Este é referido como um “alimento completo” (Davoodi *et al.*, 2013), ou seja, que fornece todos os nutrientes como proteínas, aminoácidos essenciais, gordura, vitaminas lipossolúveis e sais minerais em proporções consideradas “adequadas” (Ralston *et al.*, 2014). Nos últimos 30 anos, o consumo de leite e derivados nos Estados Unidos prolongava-se às três a quatro porções diárias, sendo parte integrante de uma refeição, tendência que tem vindo a diminuir (Cavadini *et al.*, 2000). Em 2011, a *Harvard Medical School* retirou os laticínios do *Healthy Eating Plate* (ou “Prato Saudável”, um guia visual para auxiliar a escolha de uma refeição saudável) uma vez que vários estudos epidemiológicos associavam a ingestão de leite e derivados ao desenvolvimento da doença oncológica. Associado a este problema, existe uma faixa da população que é intolerante à lactose ou alérgica a determinadas frações proteicas do leite (e.g. caseínas). No entanto, existem estudos (por vezes antagónicos) que revelam que a ingestão de leite e queijo duas até três porções ao dia parece diminuir o risco associado a problemas como o cancro do cólon (Davoodi *et al.*, 2013).

Face a esta mudança de paradigma, uma faixa da população preocupada com a saúde e bem-estar, suscetível a problemas de inflamações intestinais, procura alternativas ao leite de vaca (e.g. bebidas à base de soja, aveia ou arroz), muitas vezes sem dar conta dos problemas que a ingestão excessiva destas bebidas acarreta (e.g. desequilíbrios da função endócrina, indução de infertilidade e aumento do risco associado ao cancro da mama) (Chavarro *et al.*, 2008).

Certos problemas de saúde associados à ingestão regular de leite (e.g. cólicas em indivíduos com Doença Inflamatória Intestinal) não se verificam no consumo de bebidas vegetais. Contudo, este primeiro tem sofrido uma quebra de 17 % desde o início de 2016, segundo dados da FENALAC (2017) devido a “mitos e inverdades” promovidos juntos do consumidor final. Pensa-se que um destes mitos é o facto de se associarem problemas digestivos à ingestão da lactose, mesmo em indivíduos que produzam lactase em quantidade suficiente. Este, contudo, não é verificado no consumo de queijo. Segundo dados de Carvalho (2015) este consumo foi de 11,7 kg *per capita* ano em 2015 e “mais que triplicou” quando comparado com o ano de 2010, evoluindo a um ritmo médio anual de 3,2 %.

Associado a este aumento considerável da produção de queijo nacional, existe a produção de grandes volumes de soro de leite que é valorizado para a obtenção de proteínas com

funções benéficas para o consumidor final. Nesta ótica de valorização de subprodutos, descobriu-se que um tipo específico de soro de leite fermentado (proveniente tanto de leite de vaca, cabra ou ovelha) de uma determinada proveniência apresenta um papel funcional benéfico (Santos *et al.*, 2015). Este papel funcional pode ser descrito como um alimento que para além do carácter nutricional, “possui microrganismos viáveis, como bactérias lácticas ou leveduras” que “exibem um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro, após ingestão, devido à melhoria das propriedades da microflora nativa” (Gomes e Malcata, 1999).

Em geral, não tendo em conta o SL específico utilizado por Santos e colaboradores (2016), o soro revela potencial antitumoral (Sgarbieri, 2004), potencial antiviral (Madureira *et al.*, 2007) e apresenta um papel estimulante no sistema imunitário (Madureira *et al.*, 2007). O soro de leite (ou soro de queijo) (SL), quando fermentado apresenta um papel de agente antibacteriano (Sonomoto e Yokota, 2011). Este papel antibacteriano já foi aplicado no decorrer de trabalhos de investigação, em indústrias de minimamente processados (Santos *et al.*, 2015). O efeito antibacteriano resulta da acumulação de ácido láctico que se forma no processo fermentativo e dos péptidos que resultam da proteólise das proteínas do SL, tendo esse mesmo SL revelado eficácia no decréscimo de patogénicos das matérias-primas.

Em investigações anteriores (Santos *et al.*, 2015), foi demonstrado que um tipo específico de soro de leite de uma determinada proveniência (mediante determinadas condições de fermentação) origina péptidos com efeitos benéficos para o consumidor.

A presente dissertação assenta no impacto que o soro de leite tem em processos inflamatórios e do potencial deste em inibir duas metaloproteinases de matriz (denominadas gelatinases: a MMP-2 e a MMP-9). A inibição destas enzimas é desejável no tratamento de inflamações do cólon, uma vez que estas são precursoras de outros problemas de saúde, nomeadamente da doença oncológica (Romano *et al.*, 2016; Triantafillidis *et al.*, 2009). A procura de inibidores específicos para estas MMPs (provenientes de fontes naturais) são, por isso, bastante desejáveis.

1.1. Leite

1.1.1. Leite: definição, benefícios e problemas associados

De acordo com o Regulamento (UE) Nº 1308/2013 a designação de leite fica exclusivamente reservada ao “produto de secreção mamária, normal, proveniente de uma ou mais ordenhas, sem qualquer adição ou extração.” Esta designação pode ser utilizada para o leite que tenha sido submetido a um “tratamento” do qual não resulte qualquer alteração da sua composição e pode ser utilizada, com um ou mais termos, para designar o “tipo, classe qualitativa, a origem e/ou a utilização prevista do leite, para descrever o tratamento físico a que o leite foi submetido ou a alterações verificadas na composição do mesmo, desde que tais alterações se limitem à adição e/ou à extração de componentes naturais do leite”.

O leite e os produtos lácteos (e.g. iogurte e queijo) são uma fonte de proteína de elevada qualidade, o que faz com que seja fornecedor de uma grande variedade de aminoácidos, em grande parte, de carácter essencial (Ralston *et al.*, 2014). Além do seu elevado valor nutricional, tem sido reportada uma grande variedade de atividades biológicas associadas à componente proteica do leite e ainda, ao elevado conteúdo em compostos com potencial bioativo como o “cálcio, vitamina D e ácido linoleico” (Rozenberg *et al.*, 2016; Sanches, 2015). É amplamente visto como um alimento saudável sendo parte integrante de uma refeição, e tem sido fortemente incluído nas refeições como forma de alcançar a dose diária recomendada de 1000 mg.d⁻¹ de cálcio (Kanis *et al.*, 2013). Em proporções consideradas aceitáveis (um a dois copos de leite ou fatias de queijo), o leite de vaca é benéfico numa alimentação equilibrada. Apresenta constituintes como eletrólitos, proteínas e péptidos que podem ter um efeito benéfico a nível da pressão sanguínea (Jauhiainen e Korpela, 2007). Este contém 3,5 % de proteína, que consiste em caseínas (80 %), sendo estas classificadas como α , β e κ caseínas e proteínas do soro de leite (20 %).

Em 2012, uma das grandes alterações que surgiu no “Prato Saudável” definidos pela *Harvard School of Public Health* foi a remoção do leite e laticínios da considerada “dieta saudável”, apesar destes continuarem na Pirâmide dos Alimentos (Figura 1). Esta redução surgiu de estudos epidemiológicos que associam o leite a diversos problemas de saúde, pelo que a ingestão deste se deve cingir a uma ou duas porções por dia. Mais concretamente, várias investigações apontam que o consumo excessivo de leite se encontra associado ao aparecimento de cancro na próstata (Tat *et al.*, 2017), cancro da mama e “possível aparecimento” de cancro nos ovários (Faber *et al.*, 2012; Merritt *et al.*, 2013). Alguns investigadores admitem também a hipótese de que o processo industrial atual de produção de leite de vaca altere a sua composição hormonal, de modo que o consumo deste pode levar

a um aumento no risco de cancro relacionados com hormonas (Malekinejad e Rezabakhsh, 2015).



Figura 1. Pirâmide dos Alimentos como se encontra definida pelo Departamento de Nutrição da *Harvard School of Public Health* (2016) sendo que os laticínios ocupam o segundo patamar. Na base da pirâmide, para além das recomendações na dieta, encontra-se demarcada a prática de exercício físico diária.

Danaei e colaboradores (2011) reportaram que globalmente, o número de indivíduos com diabetes praticamente duplicou nos últimos 30 anos, podendo a maior parte destes casos ser evitados através da dieta e prática de exercício físico. A nível nacional, também existe um número alarmante de casos (estima-se que cerca de 10 % dos portugueses em 2015 apresentam diabetes, segundo o Serviço Nacional de Saúde) (Observatório da Diabetes, 2016). Associado a esta problemática, foi verificado que o consumo elevado de laticínios está associado ao desenvolvimento de Diabetes tipo I em crianças (os diabéticos tipo 1 produzem anticorpos contra as proteínas do leite, o que é raro acontecer em pessoas saudáveis) (Virtanen *et al.*, 1998).

Em detrimento do leite e derivados, tem vindo a ser aconselhada a ingestão de hortícolas na obtenção da dose diária recomendada de cálcio (e.g. legumes de folhas verdes, feijões, brócolos, soja e tofu). Em adição aos problemas levantados da ingestão excessiva de leite, este pode causar diversas alergias e/ou intolerâncias alimentares, associadas à lactose ou à caseína. A presença de hormonas no leite é nociva para a saúde uma vez que está associado a desequilíbrios hormonais e desenvolvimento de tumores (Malekinejad e Rezabakhsh, 2015).

Em 2015, o consumo de leite em Portugal, foi de 71,0 kg/hab.ano⁻¹, o valor mínimo obtido desde 1985 e inferior em 11,7 kg ao consumo médio verificado no período 1980 a 2015. A tendência de redução de consumo leite iniciou-se em 2005 e continuou até 2015, a uma taxa média anual negativa de 2,4 % (Figura 2) (Carvalho, 2015). Já o queijo, o terceiro produto lácteo mais consumido, apresentou um consumo *per capita* de 11,7 kg/hab.ano⁻¹ em 2015, e teve um aumento de consumo ao longo do período considerado. Contudo, na última década considerada, tem apresentado um declínio de consumo progressivo.

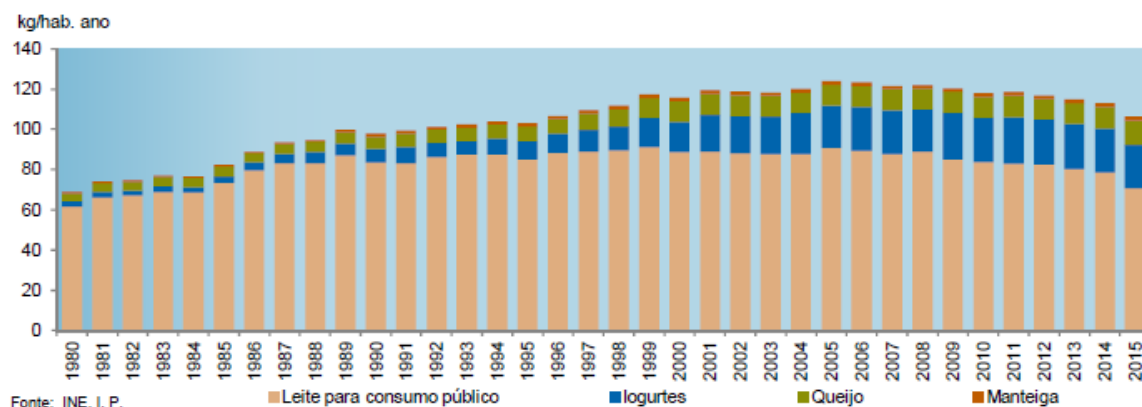


Figura 2. Evolução nacional do consumo de leite e produtos lácteos (por kg/hab.ano⁻¹) (de iogurte, queijo e manteiga) no período de 1980 a 2015. Adaptado de Carvalho (2015).

1.1.2. Alergias e intolerâncias ao leite

A alergia e a intolerância à lactose designam problemas completamente distintos. Indivíduos com intolerância à lactose não conseguem digerir o açúcar constituinte do leite (lactose, o açúcar mais abundante) porque apresentam uma deficiência nos níveis de lactase, uma enzima produzida a nível das células da parede do intestino delgado sendo necessária para metabolizar a lactose. A falta desta enzima causa sintomas como “dores abdominais, flatulência ou diarreia” (IDF, 2008). No aparelho digestivo, a intolerância à lactose apresenta efeitos negativos em indivíduos que padeçam da Doença de Chron e Doença Inflamatória Intestinal, podendo ainda resultar em colites, refluxo gástrico e leve obstipação (Menezes *et al.*, 2013).

Cerca de 75 % da população mundial sofre de intolerância à lactose, contudo apenas 20 % dos adultos retém efetivamente a intolerância (Swagerty *et al.*, 2002). De acordo com a Sociedade Portuguesa de Gastroenterologia, cerca de um terço da população Portuguesa sofre de intolerância à lactose (3 milhões de indivíduos).

Por outro lado, as alergias alimentares designam “reações adversas a alimentos, dependentes de mecanismos de imunidade, mediados ou não por imunoglobulinas E (IgEs) ou outras células imunológicas (Zanin *et al.*, 2002). As alergias alimentares mediadas pelas

IgEs são caracterizadas pela sua rápida instalação e aquelas que não são mediadas por IgEs apresentam manifestações clínicas tardias o que torna o diagnóstico difícil (Eigenmann *et al.*, 1998).

Em termos concretos, as alergias ao leite ou a derivados do leite não se encontram diretamente relacionadas (IDF, 2008). Indivíduos com uma alergia ao leite ou derivados apresentam sintomas que resultam de uma reação do sistema imunitário a um invasor. Esta reação pode causar inflamações a nível do estômago, vômitos, fezes com presença de sangue e até choque anafilático; uma resposta que pode pôr em causa a vida do indivíduo.

No caso da alergia ao leite de vaca, os agentes responsáveis são encontrados maioritariamente nos derivados do leite. Os agentes responsáveis por estas reações são proteínas do leite de vaca como as caseínas, a β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina do soro e imunoglobulinas (Gasparin *et al.*, 2010) embora se estimem que mais de 20 tipos de proteínas possam causar alergia com graus de alergia distintos (Sharma *et al.*, 2001). A difícil digestibilidade da ALA e da BLG também parecem estar por detrás do fenómeno de intolerância. O facto das proteínas do leite de vaca constituírem os primeiros antigénios alimentares a serem introduzidos na dieta humana, pode explicar o facto desta alergia ser das mais frequentes e precoce (Kneepkens e Meijer, 2009).

1.1.3. Bebidas vegetais alternativas ao leite de vaca

Até agora, uma das principais alternativas ao consumo de leite tem sido o consumo de bebidas de origem vegetal, com alto teor proteico e enriquecidas em cálcio, nomeadamente as bebidas de soja, amêndoa, arroz, aveia e côco.

Das bebidas alternativas ao leite de vaca, a soja tem ocupado um lugar central como alternativa mais saudável ao leite, por ser de origem vegetal e pelo elevado conteúdo proteico. Contudo, esta apresenta algumas desvantagens nutricionais que podem envolver graves riscos para a saúde, apesar destes não serem amplamente divulgados. Destas preocupações, denota-se a presença de compostos com efeitos indesejáveis (*e.g.* isoflavonas da soja que são receptores naturais de estrogénios) (Setchell, 2001).

A soja, apesar de ser rica em proteínas, não apresenta todos os aminoácidos de carácter essencial numa dieta numa quantidade adequada, tendo baixo teor do aminoácido metionina (534 mg por 100 mg) (Whitbread, 2017), que se encontra abundantemente disponível nos laticínios (169 mg por 100 mL) (Whitbread, 2017), sendo até de 52 % da dose diária recomendada num iogurte magro. Para além disto, as bebidas à base de soja apresentam um elevado conteúdo em açúcares simples e aromas de modo a conferir sabor, uma clara desvantagem em termos nutricionais.

1.2. Queijo

1.2.1. Queijo: definição, indústria e impacto ambiental

Segundo o *Codex Alimentarius* (Codex Standard 283, 1978) (FAO, 2013) o queijo é “um produto fresco ou curado, semiduro, duro ou extra duro que pode ser revestido e no qual a relação proteínas do soro/caseína, não pode exceder a do leite”, obtido por:

- Por coagulação total ou parcial da proteína do leite, do leite desnatado, parcialmente desnatado, nata, nata do lactossoro ou leiteinho, ou qualquer combinação destes, graças à ação do coalho ou outros agentes apropriados e por dessoramento parcial do lactossoro resultante desta coagulação respeitando o princípio de que o fabrico do queijo resulta numa concentração da proteína do leite (em particular na fração da caseína) e que, em consequência, o teor proteico do queijo será significativamente maior de que o teor de proteína da mistura dos ingredientes dos quais o queijo foi feito;
- Pelo emprego de técnicas de fabrico que provoquem a coagulação do leite e/ou das matérias-primas dele derivadas de forma a obter um produto final que tenha as características físicas, químicas e organoléticas referidas no ponto anterior.

O processo de fabrico de queijo encontra-se esquematizado na Figura 3 e salvo variedades específicas de queijo, é relativamente semelhante. No fabrico do queijo, o leite é inicialmente submetido a uma série de operações de tratamento e padronização que variam consoante a composição físico-química do leite e com o tipo de produto final pretendido.

Genericamente o leite, tratado ou não termicamente, é conduzido para cubas onde se dá a sua conversão em coalhada, através do processo de coagulação das principais proteínas do leite, as caseínas através da via enzimática. A qualidade e o tipo de soro do leite obtidos do fabrico de queijos, são diferentes, dependendo do tipo de queijo e do nível de processamento aplicado na obtenção do queijo, sendo obtido soro ácido ou soro doce conforme as condições descritas em “1.3.1 Soro de leite: Definição e história”. O rendimento do processo de coagulação é notoriamente baixo (Lucey e Kelly, 1994).

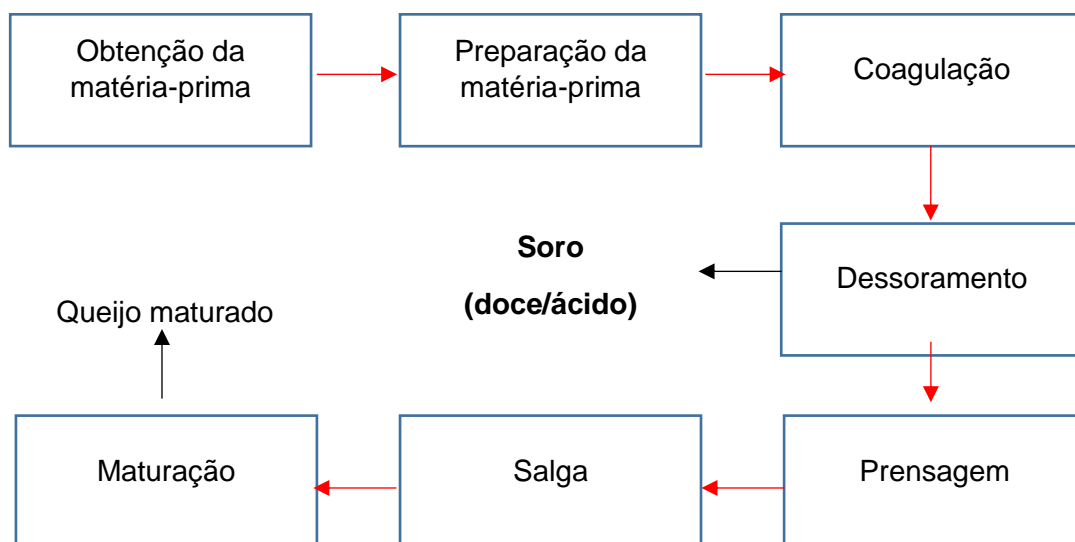


Figura 3. Diagrama genérico de fabrico de queijo de grau variável de maturação. Após a etapa de prensagem há obtenção de um produto denominado “queijo fresco”. Após maturação há obtenção de um queijo maturado. A etapa de dessoramento corresponde à etapa de obtenção do soro, imediatamente após coagulação das caseínas do leite.

É necessária uma tecnologia de processamento avançada para fazer produtos de soro do leite, como o concentrado de soro proteico e a lactose em pó (Figura 4). Esta capacidade de resposta deve ser direccionada para uma indústria de elevado volume de produção, de modo a introduzir na mesma um carácter de produção sustentável.

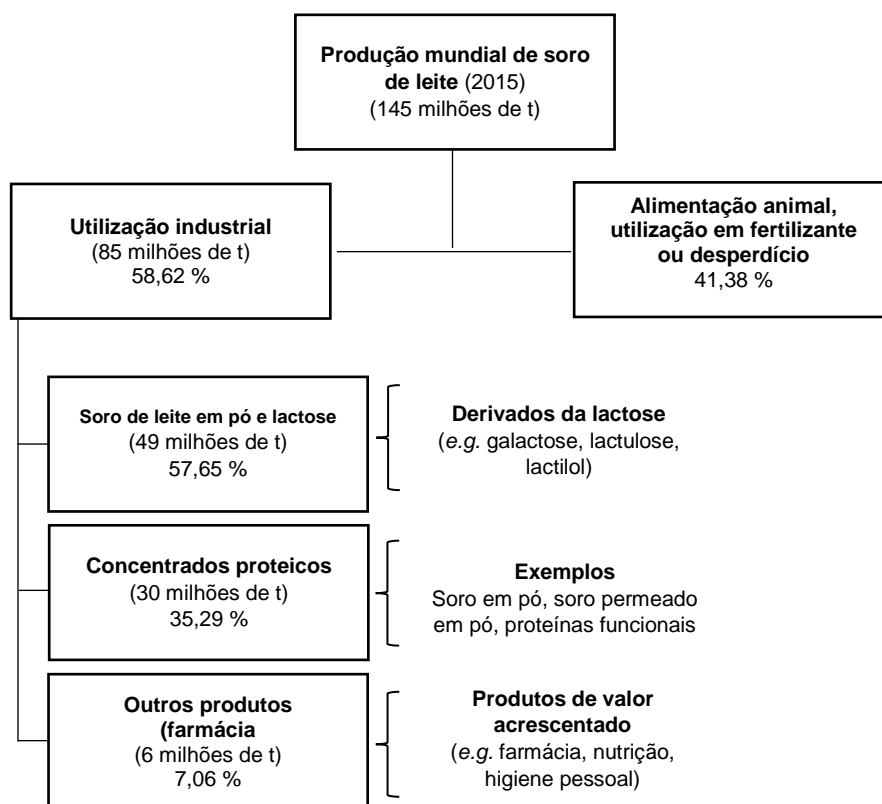


Figura 4. Balanço mundial da utilização do soro de leite. Adaptado de Tsakali *et al.* (2010).

O soro é considerado um dos coprodutos que apresenta maior impacto poluente sendo que apresenta valores de CBO₅ e CQO ditos “elevados” (Tsakali *et al.*, 2010). A CBO₅ designa a quantidade de O₂/mg necessária para efetuar a uma oxidação biológica da carga orgânica por litro de soro, ao longo de 5 dias. Já a CQO designa a quantidade total de oxigénio necessária para oxidar toda a matéria orgânica e transformá-la em dióxido de carbono, em água, e em matéria inorgânica oxidável). Em média, os valores de CBO₅ de um efluente de soro de leite de vaca são da ordem dos 35 000 a 55 000 mg O₂.L⁻¹ (Tsakali, *et al.*, 2010) e os valores de CQO são da ordem dos 16 700 mg O₂.L⁻¹ a 28 960 mg O₂.L⁻¹ (Costa, 2011). A lactose é um dos constituintes maioritariamente responsáveis por estes valores (Assadi *et al.*, 2008).

Como efluente industrial, o soro de vaca apresenta maiores valores de CBO₅ e CQO que o soro de ovelha e de cabra (Costa, 2011). Em termos de valores, o soro de ovelha e o de cabra são respetivamente de 11 720 a 18 250 mg.L⁻¹ O₂ face a 7 170 a 16 700 mg/L O₂. Considerando que anualmente se produzem cerca de 145 milhões de toneladas de soro, a procura de novos métodos para a utilização de soro é vista como bastante apreciável do ponto de vista industrial e económico. A extensão das etapas genéricas de tratamento de uma indústria produtora de queijo encontram-se esquematizadas na Figura 5.

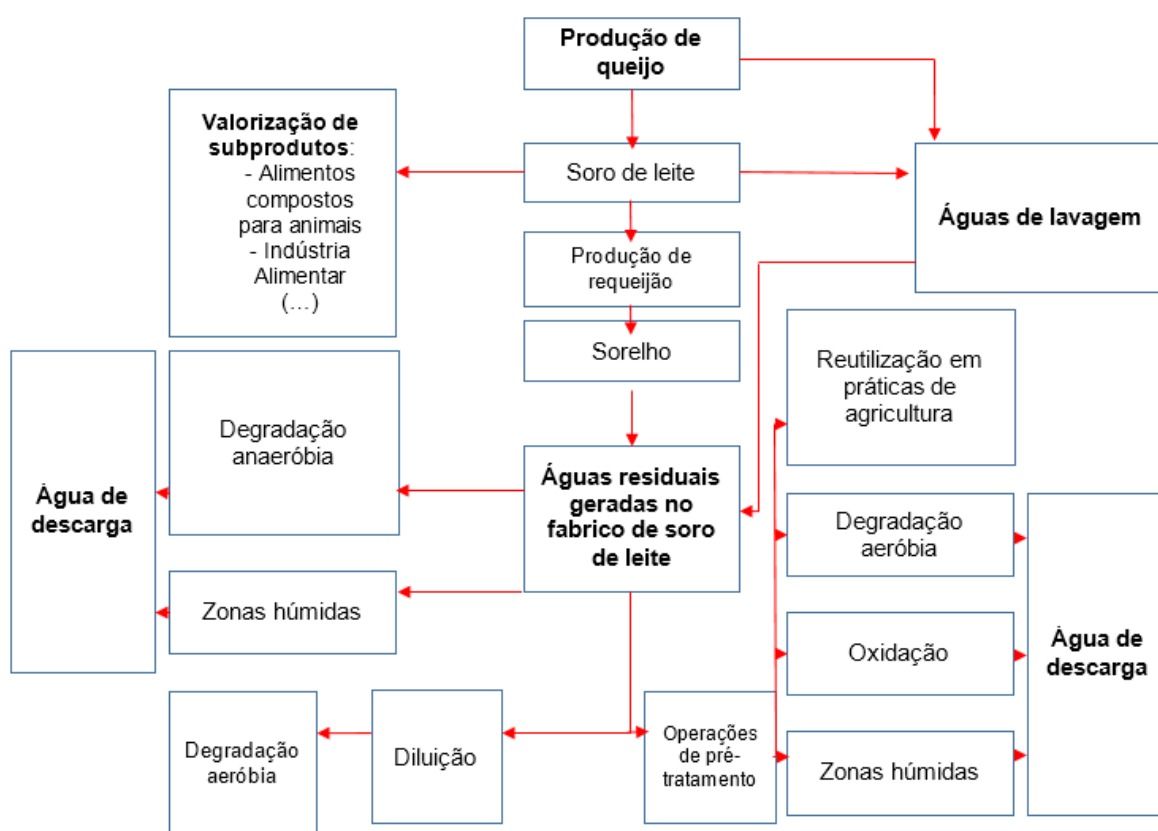


Figura 5. Etapas de transformação do soro de leite desde a sua produção, até ao fabrico de requeijão e às respetivas operações de tratamento de águas residuais.

1.2.2. Economia circular na produção de queijo

Em termos globais, a indústria dos laticínios pode beneficiar das oportunidades existentes em dois grandes aspetos: prolongar a “vida útil dos produtos” e “criar produtos competitivos que sejam duradouros” (Comissão Europeia, 2016). A eficiência na utilização dos recursos e a gestão de desperdícios das indústrias são elementos-chave na política ambiental europeia.

As atuais tendências de aumento populacional, crescimento da procura e consequente pressão nos recursos naturais têm vindo a sublinhar a necessidade das sociedades modernas avançarem para um paradigma mais sustentável; uma economia mais "verde" que assegure o desenvolvimento económico, a melhoria das condições de vida e de emprego, bem como a regeneração do "capital natural". É defendido como uma solução alternativa para minimizar consumos de materiais e perdas de energia.

No paradigma atual, há necessidade de se passar de uma economia linear para uma economia circular. Nesta, a procura de produtos que deem destino a estes excedentes é vista como necessária numa ótica de sustentabilidade, enquadrando-se na lógica de economia circular. Esta economia circular (Figura 6) visa a transformação de coprodutos ou resíduos de uma indústria alimentar em possíveis matérias-primas. Estas novas matérias-primas resultam na criação de valor e de novas oportunidades em termos de conceção ambiental (Comissão Europeia, 2016).

Em termos de queijarias de pequenas dimensões, se for efetuada uma valorização do soro de leite, os custos de exploração da instalação podem decrescer significativamente (Costa, 2011). Dentro desta ótica de valorização, podem-se desenvolver produtos à base de soro de leite, nomeadamente bebidas com soro de leite. Vários estudos têm sido desenvolvidos nessa ótica de aproveitamento (Božanić *et al.*, 2014).

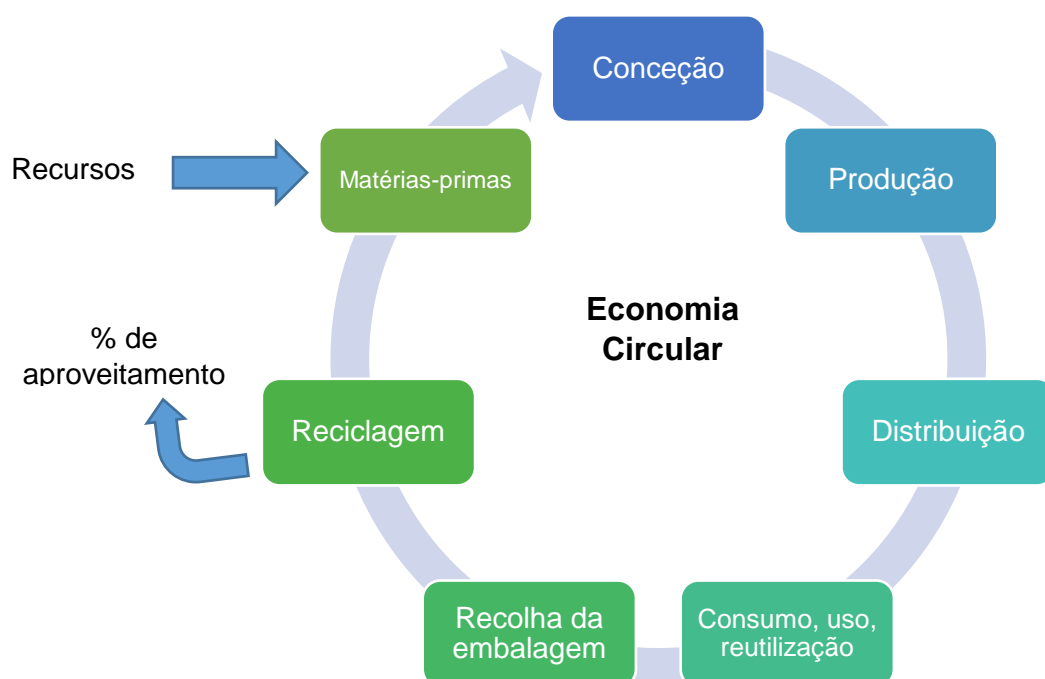


Figura 6. Representação esquemática generalizada do conceito de economia circular adaptada em termos de indústrias alimentares. Adaptado de Comissão Europeia (2016).

O conceito de economia circular constitui uma resposta ao desejo de um crescimento sustentável no contexto da pressão crescente que a produção e o consumo exercem sobre o ambiente e os recursos mundiais. Até à data, a economia tem funcionado maioritariamente num paradigma linear de “recolha, produção, eliminação” segundo o qual todos os produtos alcançam um período denominado “fim de vida útil”. A economia circular traz várias oportunidades na medida em que melhora a conceção ecológica (reduzindo a emissão de gases com efeito de estufa), promove a reutilização de resíduos (que geram poupanças líquidas para empresas) e é também criadora de postos de trabalho. Estimativas apontam para uma criação de “mais de dois milhões de postos de trabalho em comparação com um cenário de manutenção da situação atual” (Comissão Europeia, 2016). Em termos gerais, a implementação de medidas para aumentar a produtividade dos recursos em 30 % até ao ano de 2030 poderá também apresentar um aumento no PIB europeu em cerca de 1 % (Cambridge Econometrics, 2014).

A transição para uma economia circular redireciona o foco para a “reutilização, reparação, renovação e reciclagem dos materiais e produtos existentes”. O que era visto como «resíduo» pode ser transformado num recurso. Envolve o aumento e o prolongamento do uso de produtos “duradouros, reutilizáveis ou reciclados” em vez de serem deitados ao lixo e as respetivas embalagens eliminadas por processos de combustão.

Em exemplos concretos, nas empresas de laticínios também se verifica a aplicação do conceito de economia circular, através da produção de recursos, nomeadamente, da produção de biogás através da digestão anaeróbia do soro de leite (Antonelli *et al.*, 2016; Blades *et al.*, 2017).

1.2.3. Produtos de soro e economia circular

Nas indústrias de laticínios, a reutilização do soro de leite entra na ótica de economia circular. O aproveitamento do soro de leite consiste na aplicação direta da transformação de um “resíduo num recurso”, por exemplo na incorporação de produtos lácteos (*e.g.* requeijão).

Estes produtos lácteos são passíveis de entrar na alimentação humana; em termos de legislação europeia, o Regulamento (EU) nº 1308/2013, do Parlamento Europeu e Conselho, de 17 de dezembro de 2013 define como “produtos lácteos” “os produtos derivados exclusivamente do leite, considerando-se que lhe podem ser adicionadas as substâncias necessárias ao fabrico de cada produto, desde que tais substâncias não sejam utilizadas para substituir, total ou parcialmente, qualquer componente do leite”. Numa ótica de desenvolvimento de novos produtos, há possibilidade de fabricar bebidas à base de leite e derivados dado que não haverá substituição das proteínas do soro de leite.

1.3. Soro de leite

1.3.1. Definição e história

O soro do leite ou soro de queijo é um subproduto ou coproduto aquoso derivado da produção de “queijos duros, semiduros e de pasta mole” (96 %), da indústria de produção de caseína (6 %) e em menor grau, iogurte concentrado (Božanić *et al.*, 2014). É a porção do queijo que sobra após a caseína e a gordura do leite darem origem à coalhada, nomeadamente através do tratamento enzimático (por enzimas de origem animal (provenientes do coalho) ou de origem vegetal (provenientes do cardo)). Nas indústrias de produção de queijo, este subproduto é obtido a um custo praticamente nulo, uma vez que resulta da produção direta de queijo.

Estima-se que o soro tenha sido descoberto há cerca de 3000 anos (Smithers, 2008). Foi durante muito tempo visto como um desperdício das indústrias dos laticínios (Smithers, 2008), mas desde há várias décadas que o estatuto de “desperdício” tem sido contestado por já se poder aproveitar grande parte deste coproduto e não só para alimentação animal (Galsmar e Bergmann, 1967). Durante várias décadas, foi eliminado *in situ*, mas só a partir do século XX é que se iniciou a introdução de legislação aplicada para impedir que o SL não tratado fosse eliminado sem tratamentos prévios (Smithers, 2008). Em particular, a legislação atual

contempla os Decreto-Lei n.º 152/2017 de 7 de dezembro e o Decreto-Lei n.º 348/2007 de 19 de outubro para parâmetros de emissões de águas residuais mistas (Costa, 2011).

No fabrico de queijo, no caso da coagulação ser realizada por via ácida, o SL resultante denomina-se por “soro ácido” (pH compreendido entre 4,6 e 4,8), e quando é realizada por ação de enzimas proteolíticas, o soro resultante é denominado como “soro doce” (pH entre 5,9 e 6,4). O soro ácido é maioritariamente obtido de leite desnatado utilizado no fabrico de queijo fresco, *ricotta* ou queijos de estrutura semelhante e é o soro que no presente trabalho se pretende reaproveitar na forma duma bebida. O soro doce é maioritariamente obtido de leite utilizado no fabrico de queijos como *Cheddar*, *Mozzarella* e queijo do tipo *Suíço*. O soro doce apresenta menor acidez e maior qualidade em termos das proteínas que se podem obter (Tetra Pak, 2016).

Ao longo das últimas décadas, têm sido feitos vários esforços para transformar grandes volumes de soro de leite gerados como subprodutos da indústria do queijo num produto alimentar adequado (Djurić, *et al.*, 2004). Apesar do aproveitamento de soro para fabrico de requeijão ainda se obtém o soro, que necessita de tratamentos adicionais ao nível das águas de lavagem.

1.3.2. Comercialização

Até muito recentemente, muita da inovação no uso de probióticos e pré-bióticos tem sido verificada na área dos laticínios, com uma vasta gama de produtos como iogurtes “promotores de saúde” (ao auxiliar o trânsito intestinal), *skyr*, quefir e iogurtes provenientes de fermentação no mercado global.

No mercado internacional o soro é comercializado em três formas distintas: “concentrado de proteína de soro” (WPC), “isolado de proteína de soro” (WPI) e “proteína hidrolisada de soro” (HWP) (Mordor Intelligence, 2017). O WPC, é alto em lactose e pobre em proteína, constitui 25 % do total do *share* do mercado. É utilizado na produção de bebidas proteicas e suplementos nutricionais. WPCs, apresentam um *share* de mercado de 60 % e são utilizados em aplicações médicas e nutricionais. As proteínas do soro são extremamente versáteis quanto ao uso e encontram as suas aplicações na forma de fórmulas para bebés, pastelaria e confeitaria, *snacks* e laticínios. Até 2022, espera-se que seja um segmento de maior crescimento em termos de produtos alimentares, atingindo 9 mil milhões de dólares (Mordor Intelligence, 2017). Com um valor nutricional claramente distinto, 45 % do mercado do soro de leite foi alocado apenas para suplementos de dieta. Em Portugal, este segmento capta, atualmente, 8% do valor do mercado. Em termos de grupos-alvo, a fatia dos desportistas será

das mais importantes para a comercialização de uma bebida à base de soro de leite, uma vez que estes extraem os benefícios da ingestão de uma fonte proteica de um modo eficaz.

Prevê-se que até ao ano de 2025, a produção apresentará um crescimento constante, resultante de um aumento progressivo do fabrico de queijo a nível mundial (26 milhões de toneladas), resultante de alterações socioeconómicas e demográficas que incentivam a compra de laticínios (Blaskó, 2010) (Figura 7).

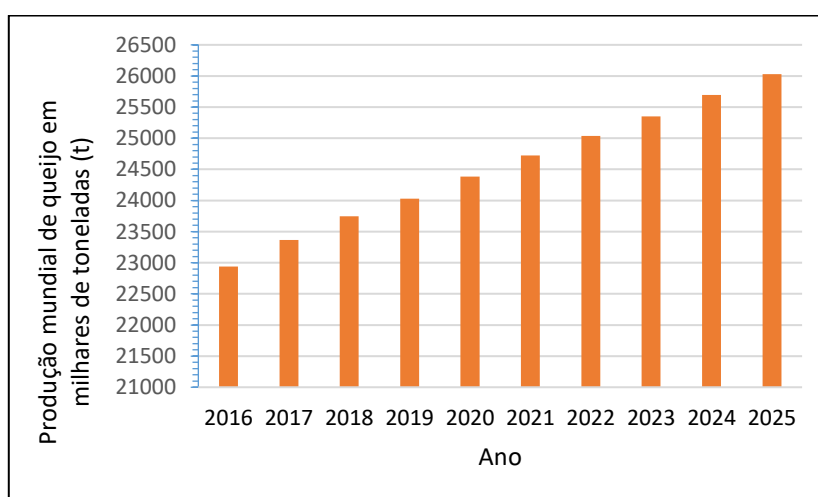


Figura 7. Projeção mundial de produção de queijo para o período de 2016 a 2025 (em milhares de toneladas). Adaptado de OECD/FAO, (2016).

Vários estudos têm demonstrado que o consumo de leites fermentados promove diversos benefícios na saúde, destacando-se, a viabilidade dos microrganismos ingeridos (que induzem mudanças positivas sobre o ambiente intestinal) e dos metabolitos produzidos no leite fermentado, através de efeitos secundários positivos.

Produtos como leites fermentados já se encontram comercializados em Portugal sendo que estes contribuem ativamente para a “proteção e reforço do sistema imunitário” ao garantir nutrientes e fermentos lácteos do leite, essenciais ao bom funcionamento do organismo (Parvez *et al.*, 2006). A fermentação do soro de leite constitui uma vantagem já que no processo fermentativo são produzidos péptidos com efeitos pré-bióticos consideráveis (Madureira *et al.*, 2007; Smithers, 2008), particularmente com capacidade anti-inflamatória. Em termos de bebidas fermentadas, existem três grandes grupos de comercialização de produtos fermentados obtidos do leite de vaca: iogurtes e bebidas baseadas no iogurte, leite e natas ácidas e sobremesas com base em laticínios.

1.3.3. Caracterização nutricional

O soro representa cerca de 85 a 90 % do volume de leite e retém aproximadamente 50 a 55 % dos nutrientes do leite (Siso, 1996). A nível mundial, estima-se que cerca de 89 % do leite utilizado para o fabrico de queijo seja convertido em soro (Abreu, 2014).

O soro de leite líquido apresenta uma composição de 93 a 94 % de água e contém uma percentagem aproximada de 5 a 6 % de sólidos presentes no leite. Apresenta vestígios de gordura (igualmente provenientes do leite) (0,36 %), minerais (0,53 %), vitaminas e ácidos orgânicos ($\leq 0,5$ %). Em termos de açúcares, a lactose (um dissacárido derivado da condensação da α -D-glucose e galactose) é o principal constituinte (Tabela 1). As proteínas do soro são extremamente valorizadas devido ao alto valor biológico (Figura 8), superior a proteínas de origem animal (e.g. ovos (Smithers, 2008), caseínas do leite (Smithers, 2008) e de origem vegetal (e.g. soja (Smithers, 2008) mas também devido ao alto conteúdo em aminoácidos sulfurados (e.g. metionina e cisteína). Também são valorizadas pelo conteúdo em aminoácidos essenciais, com uma composição rica em leucina, isoleucina e valina (Smithers, 2008). Estes apresentam funções metabólicas de regulação de proteína e glucose no sangue, intervêm no metabolismo dos lípidos e podem também apresentar funções no controlo de peso (Smilowitz *et al.*, 2005). Apesar disto, representam uma fração de menos de 1 % do total dos sólidos (Jeli *et al.*, 2008).

Tabela 1. Composição média aproximada de soro de leite ácido e soro de leite doce resultantes do fabrico de queijo (Kumar, *et al.* 2016).

Parâmetro	Soro de leite doce (pH 5,9 – 6,4)	Soro de leite ácido (pH 4,6 – 4,8)
Sólidos totais (g.L ⁻¹)	63,0 – 70,0	63,0 – 70,0
Proteína	6,0 - 8,0	6,0 – 7,0
Lactose	46,0 – 52,0	44,0 – 46,0
Gordura	0,2 - 1,0	0,1 - 0,5
Cálcio	0,4 - 0,6	1,2 - 1,6
Magnésio	0,08	0,11
Fosfato	1,0 - 3,0	2,0 - 4,5
Citrato	1,2 - 1,7	0,2 - 1,0
Lactato	2,0	6,4
Sódio	0,4 - 0,5	0,4 - 0,5
Potássio	1,4 - 1,6	1,4 – 1,6
Cloro	1,0 - 1,2	1,0 - 1,2

O soro é amplamente reconhecido pelo seu alto valor nutricional (Brandelli, *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2015) e por si só, constitui uma matéria-prima para a produção de soro do leite em pó e produtos de valor acrescentado (e.g. produção de concentrado de soro proteico, proteína isolada do soro do leite, galactose, lactose, ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético), biogás e etanol). Também pode ser adicionado em produtos de cosmética e farmacêutica (Božanić, *et al.*, 2014).

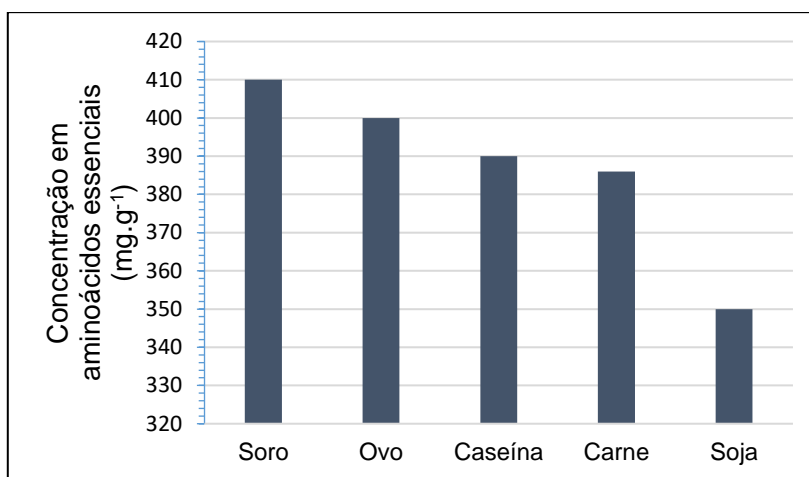


Figura 8. Comparação da concentração em aminoácidos essenciais do soro de leite (mg.g⁻¹) (em leucina e valina) em diferentes alimentos. Este apresenta-se como uma fonte rica em aminoácidos essenciais quando comparado com outras proteínas de fonte animal (e.g. ovos, carne) ou vegetal (e.g. soja). Adaptado de Smithers (2008).

Em geral, por cada quilograma de queijo de leite de vaca produzido são gerados, em média, 9 L de soro. Em termos mundiais, equivale a uma produção de cerca de 234 milhões de toneladas de soro. Dados nacionais indicam que a maior matéria-prima produzida no ano de 2016, foi o leite de vaca com 1 959 152 t de produção sendo que a 2^a produzida (tomate) foi de apenas 1 693 860 t (FAOSTAT, 2016a). A nível nacional e no mesmo período homólogo, cerca de 20 % da produção de leite (2 milhões de toneladas) foi utilizada para produzir 74 mil toneladas de queijo (Carvalho, 2015).

Cerca de 33 % da produção de leite mundial tem como destino o fabrico de queijo o que equivale a cerca de 10 a 19 milhões de toneladas por ano. Estima-se que em 2019 o consumo de queijo mundial ronde os 23,1 milhões de toneladas, o que equivale a aumento de 19,1% face ao período de 2007 a 2009 (Blaskó, 2010). Associado ao aumento do consumo de leite e queijo estará um aumento de produção de soro.

O conteúdo elevado em matéria orgânica do soro, constitui um problema de elevado impacto ambiental sendo a lactose o parâmetro responsável pelos altos valores de CBO₅ e de CQO relativamente à sua utilização (Assadi, *et al.*, 2008). A necessidade de resolver este problema, leva a que se procurem processos alternativos.

As formas mais rudimentares de eliminação do soro de leite passavam por deitá-lo diretamente para rios, lagos, para o oceano, diretamente sobre os campos ou utilizá-lo em alimentação para ruminantes. Outras opções consistiam em despejar o soro em lagoas de oxidação, zonas húmidas naturais ou no sistema municipal de esgotos apesar do elevado conteúdo em CQO e CBO levar a uma sobrecarga do sistema (Smithers, 2008; Tsakali, *et al.*, 2010). A remoção de soro constitui uma vantagem para os produtores de queijo, mas não constitui uma solução satisfatória no paradigma atual, sendo a necessidade de procurar soluções integradas extremamente importante.

O soro contém muitos compostos de valor dito acrescentado: inclui proteínas que possuem propriedades nutricionais e biológicas importantes na promoção de saúde e bem-estar assim como atuam diretamente na prevenção de doenças (Madureira *et al.*, 2007). O soro de leite também contém β -lactoglobulina, α -lactalbumina e várias proteínas minoritárias com diferentes atividades biológicas tais como enzimas e imunoglobulinas (Pihlanto-Leppala, 1999).

1.3.4. Proteínas do soro de leite

As proteínas do soro de leite, contabilizam apenas 20 % (m/m) do total do conteúdo proteico do leite, enquanto que as caseínas, insolúveis, apresentam a maior parte, 80 % (m/m) (Madureira *et al.*, 2007). Estas incluem a α -lactalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulinas, albumina do soro bovino (BSA), lactoferrina bovina e lactoperoxidase, incluindo outros compostos minoritários como glicomacropéptidos que são libertados das caseínas nas etapas enzimáticas do fabrico de queijo (Madureira *et al.*, 2010; Mohanty e Mohapatra, 2016) (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil proteico do soro de leite, respetiva concentração e massa molecular (Adaptado de Madureira *et al.*, 2007).

Composto	Concentração (g.L ⁻¹)	Massa molecular (kDa)
β -lactoglobulina	1,3	18,27
α -lactalbumina	1,2	14,17
Glicomacropéptido	1,2	6700
Albumina do soro	0,4	66
Lactoferrina	0,1	80
Lactoperoxidase	0,03	70
Imunoglobulinas	0,7	25 (cadeia leve) + 50 – 70 (cadeia pesada)

As utilizações do soro expandiram-se, como resultado do reconhecimento da excelência nutricional, das propriedades funcionais e de uma necessidade crescente de reutilização de materiais numa tentativa de produção sustentável (ou seja, de produzir de modo sustentável um produto alimentar) (Comissão Europeia, 2016). Tendo em vista o grande volume de soro gerado pela indústria, o seu alto teor poluente e a sua rica composição nutricional, o soro tem-se tornado um subproduto de importância acrescida nas indústrias alimentares.

Os concentrados de proteínas do soro de leite e os seus respetivos isolados apresentam boa solubilidade numa gama alargada de valores de pH e temperatura (Pelegri e Gasparetto, 2005), o que constituem por si só, sistemas versáteis para a preparação de alimentos. Para além disto, apresentam propriedades de formação de géis, formação de filmes e emulsificação, que são bastante desejáveis do ponto de desenvolvimento de novos produtos. Em particular, a β -lactoglobulina (um componente maioritário da proteína de soro de leite) apresenta uma estrutura gelificante e propriedades físico-químicas adequadas para aplicações em alimentos e na área farmacêutica.

1.3.5. O soro como alternativa viável ao leite

Devido ao perfil proteico das proteínas do soro de leite, a indústria alimentar utiliza o soro e os seus produtos em bens de pastelaria, bebidas, molhos, molhos para saladas, bens enlatados (frutas e vegetais), produtos de queijo (molhos, cremes de barrar), congelados, compotas, geleias e substitutos da gordura. Dada a importância nutricional destas proteínas, existe um mercado que valoriza a comercialização de soro em pó e proteínas do soro em pó. Em 2016, estimava-se que este mercado tinha o valor de 6,3 mil milhões de euros (OECD, 2016).

Contudo, o soro de leite utilizado para alimentação humana tem o inconveniente de ser pasteurizado, exceto em casos pontuais, onde é utilizado como tal na incorporação de alimentos ou rações para animais dado os elevados custos de transporte e suscetibilidade a deteriorações durante o tempo de armazenamento.

Em termos de tratamentos, é um coproduto cuja carga microbiológica pode ser controlada via fermentação, por utilização de sistemas membranares (e.g. ultrafiltração) (Lourenço, 2014), secagem (atomização) (Lourenço, 2014), misturado com farinha de cevada ou tratamento por extrusão de modo a produzir fermentos (Sluková *et al.*, 2016). É por isso necessária uma tecnologia de processamento avançada e capacidade de resposta para dar destino aos excedentes de soro. Atualmente, as proteínas do soro são recuperadas por ultrafiltração (UF) e devido ao seu tamanho, são separadas da lactose e da cinza (fração mineral), sendo que estas passam através da membrana para a fração do permeado. A fração retida é alimentada para *spray dryers* para produzir o concentrado de proteína de soro em pó

(Yee, *et al.*, 2007) no qual a concentração de proteína está no intervalo de 35 - 80 %, consoante as variáveis ajustadas ao sistema (Arpagaus *et al.*, 2010).

Consequentemente, o soro de leite é processado em várias formas (*e.g.* soro condensado, soro concentrado em pó) cada uma com características funcionais específicas (*e.g.* utilização na produção de espumas, em emulsificação, conferir alta solubilidade, oferecer gelatinização, conferir viscosidade). Estes produtos à base de soro contêm uma alta concentração de matéria seca que pode ser facilmente transportada, apresenta maiores tempos de estabilidade em armazém, misturam-se facilmente com outros alimentos e são uma fonte económica de incorporar o leite, embora indiretamente, na alimentação. Os concentrados proteicos de soro de leite são sistemas multifásicos que podem ser adicionados a diversos alimentos com o objetivo de alterar propriedades tecnológicas dos mesmos (conferir um aumento de viscosidade ou estabilizar emulsões ou espumas). Investigações recentes apontam o desenvolvimento de produtos à base de soro (refrigerantes, vinho, cerveja ou produtos com baixo valor alcoólico) que aparentam ser processos económicos e viáveis de transformar os nutrientes lixiviados na produção do queijo, em produtos de valor acrescentado (Kumar *et al.*, 2016).

1.3.6. O soro de leite fermentado como potencial inibidor de inflamações

A nível nacional, para o ano de 2007, verificou-se que em cada 146 indivíduos, 10 000 padece de Doença Inflamatória Intestinal, tendência que tem vindo a aumentar (Azevedo *et al.*, 2010). A progressão desta condição é muito sumariamente mediada por duas metaloproteinases de matriz (MMPs) e, na sua grande maioria, estes fenómenos são percursores de invasão de tumores (Lee *et al.*, 2013). Uma vez que a dieta atua como um fator preponderante na prevenção da doença oncológica (Song, *et al.*, 2016), o soro de leite fermentado pode apresentar um potencial inibidor de inflamações desejável.

As MMPs são responsáveis pela clivagem de diversos substratos (Busti *et al.*, 2010) (Figura 9). Em termos de estrutura, as gelatinases apresentam três domínios comuns (Figura 9): um domínio catalítico, onde o ião zinco interage com centro ativo, um domínio C-terminal de hemopexina e um domínio catalítico, que contém um *switch* de cisteína com capacidade para bloquear o ião zinco (tendo a capacidade de ativar a enzima quando o pró-péptido é removido) (Holanda *et al.*, 2017). As MMPs podem-se ativar mutuamente sendo que a ativação da MMP-9 se encontra mediada em parte pela atuação da MMP-2 (Toth *et al.*, 2003).

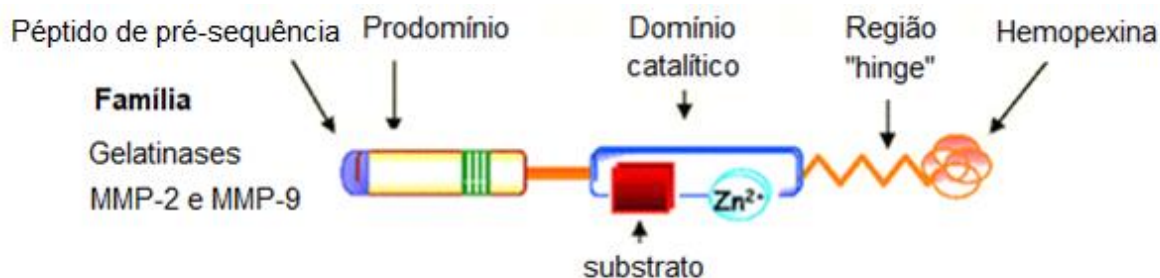


Figura 9. Estrutura da MMP-2 e MMP-9 dependente do subgrupo. As MMPs consistem num péptido de pré-sequência, um prodomínio, um domínio catalítico, uma região *hinge* e um domínio tipo hemopexina. Apresentam um local de ligação ao qual se liga o substrato e um local ao qual se liga o íon zinco (Zn^{2+}). Adaptado de (Busti *et al.*, 2010).

As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) estão envolvidas em vários processos (e.g. de menstruação no endométrio, desenvolvimento do embrião, angiogénese, regulação de vascularização e resposta inflamatória (Nagase *et al.*, 2006) (Figura 10).

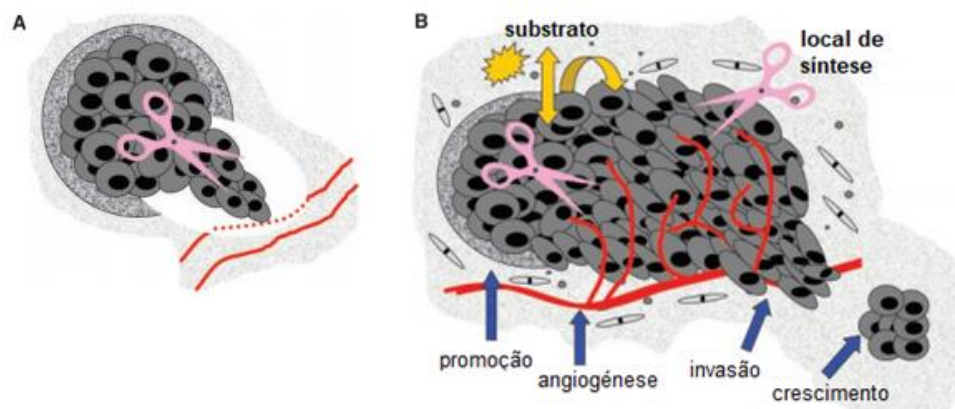


Figura 10. A. Representação esquemática das funções das gelatinases de matriz (em específico a MMP-9). A MMP-9 encontra-se representada por tesouras. Estas são responsáveis por degradar a membrana celular e os componentes da matriz extracelular, induzindo a inflamação dos tecidos e permitindo a invasão tumoral.

B. As MMPs contribuem para fenômenos de invasão incluindo fenômenos de crescimento de lesões metastáticas. As MMPs são segregadas por células inflamatórias e são indirectamente responsáveis por certas propriedades das células (e.g. crescimento, morte e migração). Adaptado de Coussens (2002).

1.3.7. Bioatividade dos péptidos resultantes da fermentação presentes no soro

A fermentação é um processo metabólico no qual os hidratos de carbono e outros compostos semelhantes, são parcialmente oxidados tendo como resultado a produção de ácidos orgânicos, álcool e dióxido de carbono. Muitos géneros alimentícios (e.g. queijos maturados, pickles, chucrute) devem as suas características a processos fermentativos realizados por microrganismos específicos. Para além do carácter organolético distinto (aroma e *flavour*), é um modo eficiente de prolongar consideravelmente o tempo de vida útil dos alimentos das matérias-primas que lhes deram origem (Vaclavik e Christian, 2008).

Visto que o soro retém aproximadamente 55 % dos nutrientes do leite (Siso, 1996), há necessidade de proceder a uma caracterização dos péptidos provenientes do leite. Estes são derivados das proteínas do leite por quebra enzimática devido à atuação de enzimas do processo digestivo, ou pelas enzimas produzidas por lactobacilos durante o processo fermentativo do leite (e.g. proteinases) (Jauhainen e Korpela, 2007).

A atividade de um péptido bioativo depende da sua sequência de aminoácidos e tamanho, que varia entre 2 a 20 resíduos de aminoácidos (Korhonen, 2009). Os péptidos tornam-se ativos após libertação da proteína precursora (podendo ser libertados *in vivo* durante os processos gastrointestinais por ação de enzimas digestivas (e.g. pepsina, tripsina ou quimiotripsina) (Yadav *et al.*, 2015).

No entanto, para um péptido ser candidato a apresentar a designação de bioativo, a sua resistência a condições do trato gastrointestinal tem de ser determinada *a priori*. O mecanismo exato através do qual os péptidos do soro de leite exercem as suas bioatividades requerem ainda estudos adicionais, mas pensa-se que exerce um efeito direto a nível do lúmen intestinal ou através de recetores na parede intestinal. Estudos *in vivo* são de carácter essencial para validar efeitos fisiológicos dos péptidos quando são administrados oralmente ou para verificar a resistência dos mesmos às enzimas do aparelho digestivo (Madureira *et al.*, 2010).

Mohantyy e Mohapatra (2016), efetuaram um levantamento das funções fisiológicas dos péptidos do leite provenientes de vários mamíferos (vaca, cabra, ovelha, búfala e camelo) e verificaram que estes exerciam um papel preponderante a nível antimicrobiano, modulador do sistema imunitário, antioxidante e anti trombócito, entre outros (Tabela 3). Um dos mecanismos mais estudados dos péptidos do leite (que aparecem no soro) é a inibição da enzima conversora de angiotensina (ACE), cuja ativação aumenta a pressão arterial. Os péptidos do leite também apresentam mecanismos adicionais que influenciam a pressão sanguínea (nomeadamente atividades opióides, ligantes a minerais e propriedades anti-trombócitas) (Tabela 4).

Tabela 3. Papel bioativo de péptidos derivados de leite (provenientes de várias espécies de mamíferos) no organismo humano (Mohantyy e Mohapatra, 2016).

Papel funcional	Local ou papel de atuação
Péptido antimicrobiano Imunomodulatório Opióide	Sistema digestivo
Péptido inibidor de ACE Anti trombócito Anti-colesterolémico Anti-hipertensivo	Sistema cardiovascular
Imunomodulatório Citomodulatório	Sistema imunitário
Péptido opióide	Sistema nervoso
Péptido dependente de Ca ²⁺ Lactoferrina	Saúde óssea

Tabela 4. Exemplos de péptidos bioativos derivados do soro de leite. Adaptado de Smithers (2008) e Korhonen (2006).

Fonte da proteína ou péptido	Péptido	Bioatividade
α -Lactalbumina (ALA)	α -Lactoforina	Inibidor de ACE
β -Lactoglobulina (BLG)	β -Lactoforina β -Lactotensina	Estimulador do íleo Contração do íleo
Albumina do soro bovino (BSA)	Albutensina Seroforina	Inibidor de ACE Contração do íleo
Glicomacropéptido	108 – 110 106 - 116	Atividade opióide Anti-trombócito
Lactoferrina	Lactoferricina	Antimicrobiana

De acordo com Cortez *et al.* (2007), o leite contém mais de 20 compostos proteicos com diferentes níveis de atividade antigénica. Dos intolerantes à lactose, a percentagem de indivíduos com intolerância à fração proteica do leite é de 66 – 82 % para a β -lactoglobulina, 43 – 60 % para a caseína e 41 – 53 % para a α -lactalbumina (Tabela 5).

Tabela 5. Listagem de algumas frações proteicas do leite e respetiva percentagem de indivíduos com alergias. Estas percentagens referem-se a indivíduos que possuem alergias a proteínas do leite (Adaptado de Cortez *et al.*, 2007).

Fração proteica	% de indivíduos sensíveis
β -Lactoglobulina	66-82
Caseína	43-60
α -Lactoglobulina	41-53
Globulina do soro bovino	27
Albumina do soro bovino	18

1.3.8. O soro como alternativa ao leite: perspetivas de mercado

Em termos de bebidas fermentadas com uma redução significativa do teor de açúcar, já se verifica uma grande aposta no mercado dos hortofrutícolas, prevendo-se um elevado potencial de penetração nos mercados externos (COMPETE, 2014).

O soro por si só, é altamente rico em proteínas: é sobretudo rico em α -lactalbumina, uma excelente fonte proteica, de valor mais elevado do que a clara do ovo ou albumina de soro bovino. Esta proteína tem sido amplamente utilizada nos mercados de nutrição, com vários benefícios uma vez que contém cerca de 10 % de proteínas chamadas de imunoglobulinas, que, entre outras propriedades, ajudam a melhorar o sistema imunológico do corpo humano. A α -lactalbumina possui a concentração mais alta (23 a 25 %) de aminoácidos de cadeia ramificada que qualquer outra fonte de proteína. Este conteúdo em aminoácidos de cadeia

ramificada é relevante para atletas, porque são os primeiros aminoácidos utilizados durante o catabolismo muscular. Têm a capacidade de aumentar a produção endógena de glutatona, um antioxidante com um papel muito importante no sistema imunológico e têm igualmente a capacidade de diminuir a dor muscular que se segue a um treino de alta intensidade.

O soro de leite fermentado surge como uma alternativa viável na medida em que através da fermentação, há produção de fatores bioativos, sendo essencial para produzir produtos de valor acrescentado e existe a hidrólise das principais proteínas. Este processo fermentativo resulta em péptidos com efeitos benéficos para a saúde (nomeadamente péptidos de capacidade anti-inflamatória). Apresenta outras vantagens, uma vez que a maior parte das proteínas alergénicas foram degradadas, sendo esta bebida apta para pessoas intolerantes. Os péptidos formados aquando do processo fermentativo contêm propriedades benéficas (e.g. anti-hipertensivas e anti-trombócitas), não apresentam gordura saturada em valor “elevado” e não apresentam lactose (para os intolerantes à lactose). Este produto seria classificado como “pronto para consumo” e ofereceria vantagens em termos de conveniência e portabilidade para um consumidor com um estilo de vida ativo (Shraddha e Nalawade, 2015).

Este deveria ser enriquecido com outros elementos (neste caso, proteínas vegetais) de modo a conferir proteínas, vitaminas e ácidos orgânicos de um modo “saudável e apelativo” (Almeida *et al.*, 2001). Esta bebida não apresentaria os contaminantes do leite (hormonas que provocam o aparecimento de doenças crónicas) ou as desvantagens do consumo de bebidas vegetais. É um produto com proteína completa, mantendo as características benéficas do leite de vaca.

1.4. Formulação de bebidas de soro de leite

1.4.1. Soro de leite no enriquecimento nutricional de bebidas

Nos Estados Unidos, o consumo de produtos designados “bebidas nutricionais” expandiu muito na última década (Pelegri e Carrasqueira, 2008). O total de vendas de produtos “nutricionalmente enriquecidos” (os quais incluem bebidas nutricionais) tem crescido aproximadamente 8 % ao ano. Este tipo de produto tem despertado o interesse de uma faixa da população preocupada com o bem-estar físico e com a saúde aproveitando cada vez mais este grupo de pessoas que associa uma dieta nutricional equilibrada a exercícios físicos moderados (Almeida *et al.*, 2001).

Existiram vários trabalhos subordinados ao tema de desenvolvimento de uma bebida com incorporação de soro de leite (Kar e Misra, 1999; Pescuma *et al.*, 2010; Baccouche *et al.*, 2013; Costa e Pintado, 2014; Nogueira *et al.*, 2016). Um produto desta natureza seria rico em aminoácidos essenciais e uma opção mais atrativa em comparação com outras formas de obtenção de proteína, uma vez que as proteínas do soro de leite são altamente solúveis.

Apesar da simplicidade relativa de formulação de uma bebida de soro, encontrar um sabor que mascare o sabor desagradável do soro de leite ácido é difícil sendo atribuída esta dificuldade ao conjunto do “ácido láctico, sal e queijo” (Cunha *et al.*, 2009). Em termos de estabilidade do produto, como o soro possui lípidos, existe a preocupação deste adquirir rancificações devido ao tratamento térmico.

Com base em estudos anteriores (Pelegrine and Gasparetto, 2003) existe “grande aceitabilidade” de bebidas preparadas a partir de soro de leite. Nestes, verifica-se que a utilização do soro fermentado na preparação de bebidas constitui uma boa alternativa para reduzir os desperdícios nas indústrias de laticínios.

Como já foi referido, os produtos de soro de leite e derivados constituem uma excelente fonte de proteínas, sendo esta uma das principais aplicações na preparação de bebidas e aposta de comercialização. Para além disto apresentam um baixo teor de gordura saturada e lactose (Almeida, *et al.*, 2001; Madureira *et al.*, 2007), sendo este último essencial para uma faixa da população intolerante à lactose que se preocupa cada vez mais com o estilo de vida e promoção de bem-estar. A incorporação do soro em bebidas de fruta já é uma realidade, como demonstraram Baccouche e colaboradores (2013) com adição de pera e Bosi e colaboradores (2013) pela adição de fibra com efeito pré-biótico.

Bosi, *et al.* (2013) na tentativa de procurarem condições que minimizem o desperdício na indústria do queijo, formularam dois tipos de bebidas: uma bebida à base de inhame e outra à base de polpa de abacaxi, ambas enriquecidas com as proteínas e sais minerais presentes no soro do leite. A proposta do projeto foi enriquecer os produtos de duas maneiras diferentes: na primeira, os produtos seriam enriquecidos com as proteínas e sais minerais do soro do leite; na segunda, apenas com sais minerais, visando beneficiar pessoas alérgicas às proteínas presentes no soro do leite tendo obtido em ambos os casos um índice de aceitabilidade superior a 70 %.

1.4.2. Farinhas pouco exploradas para a produção de bebidas

A utilização de farinhas pouco exploradas, nomeadamente de alfarroba e de bolota surge como uma oportunidade de enriquecimento nutricional ou aptidão para a bebida à base de soro. Por exemplo, o sabor achocolatado da alfarroba pode ter um efeito benéfico no atenuar do sabor do ácido láctico proveniente da fermentação. Já os ácidos gordos da bolota podem complementar a bebida uma vez que o soro possui um baixo teor de gordura. Em termos de bioatividade, a utilização destas farinhas pode acrescentar benefícios ao soro de leite, melhorando a respetiva capacidade anti-inflamatória. Em termos de bebidas lácteas, não existem trabalhos na área que verifiquem a aptidão de farinhas de alfarroba e a farinha de bolota torrada para bebidas lácteas.

Farinha de alfarroba (*Ceratonia siliqua* L.)

A alfarroba é um fruto que provém da alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L.), sendo esta maioritariamente encontrada na região mediterrânica (Khlifa *et al.*, 2013). Em termos globais, Portugal é o terceiro produtor mundial de alfarroba, com 40 385 t de alfarroba produzida por ano (FAOSTAT, 2016b).

A farinha de alfarroba é obtida a partir da moagem das vagens de alfarroba. É caracterizada por apresentar um sabor “muito doce” (proveniente da própria vagem) (Aydjn and Özdemir, 2017) e ligeiramente “achocolatado”. Apresenta um alto teor em fibra, é rica em cálcio, fósforo e potássio (Aydjn e Özdemir, 2017). Não apresenta glúten o que do ponto de vista do desenvolvimento de novos produtos é relevante dada a aptidão para doentes celíacos. A farinha já é utilizada em bebidas à base de leite, iogurtes, gelados, pães e mistura de bolos e sobremesas. Também pode ser utilizada com a finalidade de engrossar molhos.

As indústrias alimentares estão interessadas na melhoria de qualidade nutricional de alimentos à base de cereais e leguminosas (Durazzo *et al.*, 2014). Durazzo e colaboradores (2014) verificaram também que a farinha de alfarroba pode ser incorporada em novos produtos alimentares funcionais (em particular, devido às propriedades antioxidantes das sementes utilizadas no fabrico da farinha).

Farinha de bolota de azinheira (*Quercus ilex* L.)

Em Portugal, o sobreiro é uma árvore que adquire grande expressão botânica na forma de *Quercus faginea*, *Quercus rotundifolia*, *Quercus suber* e *Quercus ilex* (Ferreira-Dias *et al.*, 2007), embora apenas as duas últimas sejam a que apresentam um fruto visto como “tecnologicamente interessante”, do ponto de vista alimentar. Em particular, existem duas subespécies de *Quercus ilex* em Portugal: *Quercus ilex*. subsp. *ilex* e *Quercus ilex*. subsp. *rotundifolia*, ambas características do montado alentejano. As primeiras apresentam frutos amargos enquanto que as segundas apresentam frutos de aparência longa e sabor doce, o que é, mais uma vez, relevante do ponto de vista alimentar.

As espécies do género *Quercus* ocupam uma área de aproximadamente 1 200 000 ha, dos quais cerca de 80 % estão concentrados no Alentejo (INE, 2013). Neste panorama, Portugal surge como um país que está por detrás de 50 % de toda a extração de cortiça do sobreiro, em particular, do *Quercus suber*.. Estima-se que a bolota seja um fruto desperdiçado em 55 % da produção em Portugal, apesar de existir pelo menos um estudo de que este pode ser aproveitado desde os nutrientes até à casca (Silva *et al.*, 2016).

Atualmente, o interesse económico do sobreiro na região oeste do Mediterrâneo não está restrito à produção de cortiça. As bolotas são utilizadas para alimentação de suínos (sendo a principal fonte de alimento no inverno para o gado). Trabalhos desenvolvidos revelaram o

conteúdo proteico, composição e qualidade das bolotas (Fonseca *et al.*, 1997). A incorporação de farinha de bolota nos alimentos pode ser um modo saudável de ingerir aminoácidos essenciais, vitaminas, macro e micronutrientes e fibra dietética numa dieta (Korus *et al.*, 2015).

Optar pela bolota é um ponto da valorização do *Quercus ilex*. A bolota detém um excelente perfil de aminoácidos (semelhante ao do azeite) e óleos essenciais (Silva *et al.*, 2016). A partir da bolota, pode-se fazer farinha através de um processo semelhante à obtenção de café, sendo que a estes frutos descascados se aplica um breve processo de torrefação como se faz a nível do grão da planta do café.

Apesar do baixo aproveitamento, há muitos anos, que a bolota já faz parte da alimentação, sendo consumida em refeições como substituto de nozes, amendoins ou azeitonas, incorporada em pão ou biscoitos, ou dando origem a licores e “substitutos” de café. Estudos anteriores revelaram que a farinha de bolota possui um perfil nutricional dito interessante: é rica em fibras e em PUFA (particularmente ω -6) o que torna esta farinha interessante do ponto de vista de desenvolvimento de produtos sem glúten (Silva *et al.*, 2016). Dado isto, e sabendo que hoje em dia o consumidor e a indústria procuram alimentos funcionais mais diversificados e ativos, o desenvolvimento e caracterização de bebidas à base de bolota torna-se um ponto fulcral. Existe pelo menos um estudo sobre o desenvolvimento de uma bebida à base de bolota, desprovida da adstringência característica deste fruto, apesar de não possuir soro de leite (Costa e Pintado, 2014). Esta bebida, ao contrário do café, não apresenta cafeína, revelou propriedades antioxidantes, demonstrou um crescimento de bactérias benéficas presentes no microbioma intestinal e não apresentou toxicidade.

A bolota possui elevado valor nutricional contendo componentes que podem exercer benefícios na saúde, por exemplo a presença de amido não hidrolisável (ou amido resistente), que confere maior saciedade e não aumenta tanto os níveis de glicemia como as farinhas de trigo refinadas. O fruto surge como um “caso particular” já que nada se perde na sua utilização; com a casca podem ser produzidos extratos com “ação antioxidante e antimicrobiana” que apesar de não se utilizarem na alimentação são “promissores no desenvolvimento de cosméticos com ação anti envelhecimento” (Costa e Pintado, 2014).

A introdução de farinhas que substituem outros ingredientes e que resultam num produto funcional e de baixo custo pode ser um fator decisivo para captar a atenção do consumidor (Sousa, 2001). Uma vez que a bolota de azinheira apresenta uma quantidade considerável de polissacáridos, estes conseguem formar uma rede estruturada que aumenta estabilidade de emulsões (Raymundo, 1999).

1.4.3. Papel de espessantes: goma xantana

A goma xantana é um hidrocolóide cujo uso se verifica numa vasta gama de produtos alimentares de modo a aumentar atributos de qualidade. Entre vários tipos de produtos alimentares é utilizada para bebidas à base de leite (Saha e Bhattacharya, 2010), o que é indicado para o presente trabalho.

A goma xantana (ou xantano) é um heteropolissacárido de massa molecular elevada (2×10^6 a 2×10^7 Da) que pode ser utilizada como aditivo alimentar de grande importância (Luporini and Bretas, 2011). A estrutura primária da goma xantana baseia-se na repetição de unidades de pentassacáridos (Figura 11). É um biopolímero produzido por uma bactéria designada *Xanthomonas campestris*. Em particular, este biopolímero é produzido através de processos fermentativos na presença de açúcares simples. Apresenta funções como agente de suspensão, espessante, emulsionante e estabilizante, na indústria alimentar (mas em maior grau, na indústria de prospecção de petróleo como agente de recuperação). O papel de espessantes é preponderante no fabrico de produtos alimentares, de modo a produzir características de qualidade típicas de produtos alimentares.

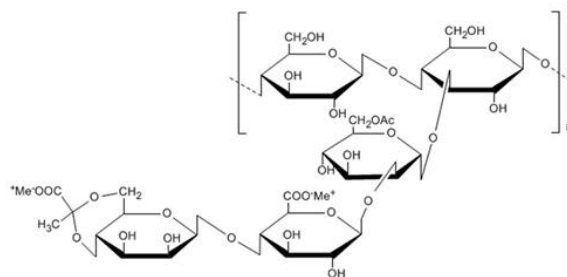


Figura 11. Estrutura molecular da goma xantana. Adaptado de (Shao *et al.*, 2012).

A cadeia principal consiste em duas unidades de glucose em ligação β-1,4 e a cadeia lateral de trissacárido é composta por duas unidades de D-manose alternando com ácido-D-galacturónico (Figura 11). As propriedades da goma xantana são extremamente particulares dada a sua estrutura: apresenta viscosidade elevada mesmo em baixas concentrações, um elevado grau de estabilidade e compatibilidade com sais, excelente solubilidade e estabilidade em soluções ácidas e alcalinas, resistência à degradação, a temperaturas elevadas e a vários níveis de pH (o que permite compatibilidade alimentar). Não apresenta toxicidade aparente e é biocompatível, sendo utilizada com aplicações médicas e farmacêuticas (Shao *et al.*, 2012). É utilizada em muitas outras indústrias como as do fabrico de papel, indústria têxtil e indústria dos cosméticos.

Em particular, apresenta a função de prevenir a separação de ingredientes numa mistura. A utilização de percentagens na ordem dos 1 % de goma xantana pode produzir um aumento

significativo da viscosidade de um líquido, uma vez que é um polieletrólito, que em solução, afeta propriedades relacionadas com as forças iónicas presentes nos alimentos.

Sob aquecimento e em soluções aquosas entre 27 e 86 °C, a goma xantana sofre uma mudança de conformação de hélice parcialmente ordenada para conformação desordenada; por outro lado, sob arrefecimento entre 86 e 32 °C, a macromolécula muda de conformação desordenada para formação de rede (Luporini e Bretas, 2011).

Trabalhos anteriores verificaram que o comportamento deste hidrocolóide em específico, permite a formação de ligações cruzadas fracas (com adição de iões monovalentes) a fortes (em presença de iões trivalentes) (Luporini e Bretas, 2011), que influencia o comportamento viscoelástico dos alimentos.

Dentro do parâmetro da qualidade, os agentes espessantes são substâncias que quando adicionadas a uma mistura aquosa, aumentam a viscosidade sem alterar significativamente as suas outras propriedades como é o caso do aroma ou textura. Contribuem para isso, para texturas mais encorpadas e agradáveis. Estes adicionam-se na forma de aditivos alimentares que não apresentam valor calórico. Podem conferir “corpo”, aumentar a estabilidade, aumentar a miscibilidade de fases com diferentes densidades específicas e melhorar a suspensão de ingredientes adicionados.

A utilização deste hidrocolóide no desenvolvimento de novos produtos alimentares é de extrema importância visto que se pretendem mimetizar características tecnológicas e sensoriais de bebidas lácteas, tanto na textura como no sabor.

1.4.4. Processos de secagem utilizados na produção de uma bebida

Na ótica de desenvolvimento de um produto funcional, há interesse em verificar-se o maior número de polipéptidos bioativos em menor volume de bebida. Para tal, há necessidade de recorrer a processos de concentração autorizados para géneros alimentícios (e.g. secagem). Estes são essenciais para passar o soro de leite líquido a um pó para este se poder solubilizar na bebida.

Existem duas razões essenciais para se proceder à concentração (Arpagaus *et al.*, 2010):

- Prevenção/inibição do crescimento e da atividade metabólica de microrganismos, evitando que haja reações de degradação, protegendo os alimentos;
- Redução da massa e volume de alimentos para transporte e armazenamento.

A separação de componentes do leite é efetuada nas indústrias alimentares com resultados bastante satisfatórios (Baldasso, 2011). Pereira e colaboradores (2015) no desenvolvimento de bebidas lácteas à base de soro, efetuaram a produção de concentrados de soro de leite

líquido por ultrafiltração (UF) seguidos de desnaturação térmica e homogeneização do concentrado filtrado assim como a produção de permeados concentrados por osmose inversa. No caso presente, a concentração do soro de leite líquido foi feita com recurso a liofilização utilizando baixas temperaturas e pressão elevada (Pereira *et al.*, 2015).

O *spray drying*, outra alternativa com tempos de espera inferior, efetuou-se com sucesso em termos de sumos de fruta (Barbosa e Teixeira, 2017) mas em termos de matérias-primas com elevada presença de açúcares solúveis revelou ser um processo “difícil” devido à elevada higroscopicidade da lactose (Lourenço, 2014).

Existem vantagens claras na adoção de técnicas de *spray drying* em detrimento de outros métodos como a liofilização de modo a produzir alimentos em pó, com humidade extremamente baixa que permite (Figura 12):

- Obtenção de partículas dispersas, esféricas e uniformes num intervalo de 1 a 5 μm ;
- Controlo da morfologia e densidade das partículas consoante as condições de temperatura (T_{in} e T_{out});
- Eficácia em termos de passagem de líquidos a formulações em pó;
- Simplicidade e eficácia de custos, possibilitando *scale-up* de escala laboratorial para uma escala industrial.

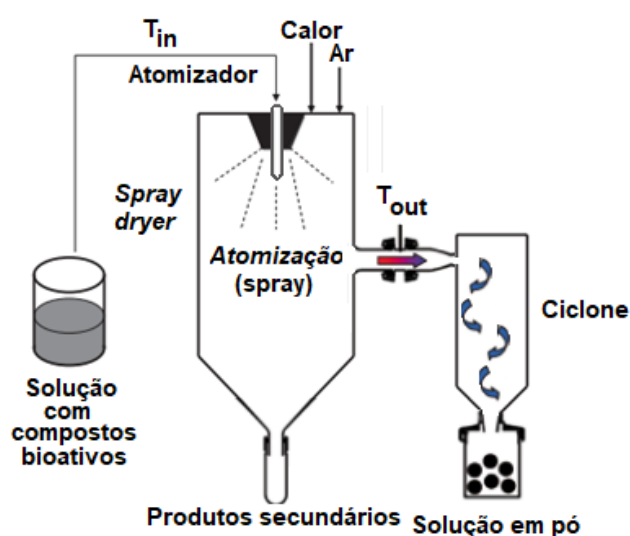


Figura 12. Esquema geral de obtenção de concentrados via *spray drying*. A nível da etapa de atomização, existe um *nozzle* necessário para pulverizar a solução, com auxílio de altas temperaturas. Adaptado de Arpagaus e colaboradores (2010) e deVos e colaboradores (2015).

Este método produz partículas de elevada qualidade e de tamanho reduzido e com características físico-químicas específicas, o que é favorável do ponto de vista das propriedades texturais e sensoriais dos produtos finais (Ray *et al.*, 2016). No entanto algumas condições de funcionamento do *spray drying* têm vantagens claras na produção de partículas

e noutros fatores associados, como a concentração do caudal de alimentação e a temperatura do ar de entrada (Walton, 2000).

A liofilização é um método de secagem no qual o solvente é congelado antes de introdução no processo (Figura 13). Posteriormente, ocorre sublimação (isto é, existe passagem direta da fase sólida para a fase gasosa sem existir passagem da fase líquida). O processo ocorre abaixo do ponto de fusão do solvente. Ocorre com uma bomba de vácuo já que a pressão reduzida, o processo é mais eficaz apesar deste poder ocorrer a temperatura ambiente. É um método cada vez mais aplicado para alimentos secos, no entanto, surgiu com a indústria farmacêutica e possuiu grandes desenvolvimentos em aplicações médicas. É bastante utilizada quando se pretende manter as propriedades biológicas das proteínas e porque retém vitaminas e compostos bioativos.

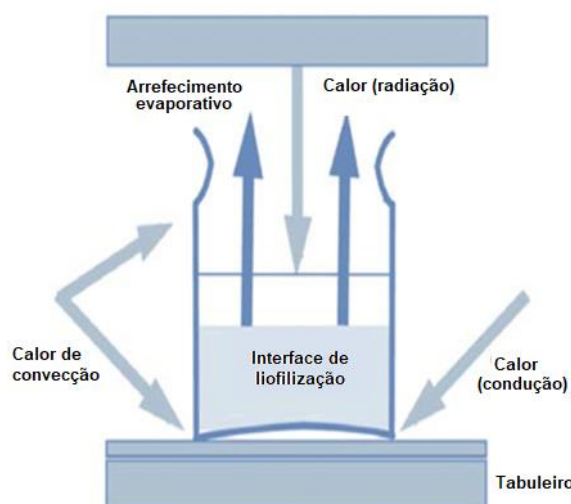


Figura 13. Exemplo ilustrativo do mecanismo de funcionamento da liofilização Adaptado de Barley (2017).

1.4.5. Reologia no desenvolvimento de produtos alimentares

A Reologia é a ciência que estuda a deformação (a nível dos sólidos) e o escoamento (a nível dos fluidos) dos corpos quando estes se encontram solicitados por uma força por unidade de área exercida na superfície de um corpo (denominada tensão). É uma ciência fundamental para o dimensionamento de equipamentos industriais (e.g. bombas e tubulações, agitadores, permutadores de calor etc.), determinação da estrutura a nível macro e micromolecular) e estudos do consumidor (nomeadamente, na aceitação e padronização de características de géneros alimentícios), no controlo da qualidade do produto (intermediário e final) e na verificação do prazo de validade de alimentos e cosméticos. Em termos de aceitação relativa à qualidade do produto existe uma propriedade determinante: a consistência. A consistência pode ser vista como uma característica física cuja avaliação é

um indicador da aptidão tecnológica dos produtos. Também é vista como um indicador preciso do tipo de matéria-prima e do processamento utilizado. Adquire um caráter extremamente relevante do ponto científico-tecnológico dentro da área de engenharia de materiais. Pretende, por exemplo, correlacionar conceitos como as propriedades de escoamento da matéria durante os processos de compressão dos materiais e assim constituir uma mais-valia no desenvolvimento de equipamentos.

Fluidos newtonianos e não newtonianos

A viscosidade pode ser reduzida a uma “medida de atrito interna de um fluido”. A nível molecular, é o atrito exercido entre dois planos de um fluido. Fluidos newtonianos apresentam um comportamento de viscosidade que é fácil de caracterizar do ponto de vista matemático. Alimentos como o mel, o soro de leite, a água e o azeite assumem um comportamento newtoniano, ou seja, cuja viscosidade é independente da velocidade de deformação, segundo a lei de Newton:

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (1)$$

Na equação 1, vem expresso que τ é a tensão (Pa), η é a viscosidade (Pa.s) e $\dot{\gamma}$ é a velocidade de deformação. Todos os fluidos cujo comportamento não pode ser descrito adequadamente pela equação de Newton são designados de “não ideais ou não-newtonianos” (Toneli *et al.*, 2005). Embora na prática, nenhum tipo de fluido em condições normais de pressão e temperatura tenha o comportamento de newtoniano, para efeitos de cálculo, pressupõe-se aproximações como é o caso de líquidos ideais ou soluções coloidais (Carrilho, 2014).

Um fluido não newtoniano não segue a lei de Newton referente à viscosidade. Esta é característica de cada tipo de fluido e indica a capacidade deste de resistir a deformações graduais. A viscosidade deste tipo de fluidos depende da velocidade de deformação exercida. Em termos alimentares, existem muitos exemplos de fluidos com comportamento não newtoniano (*e.g.* suspensões de farinha de amido, melaço, leite). Em termos gerais, soluções salinas e de polímeros fundidos também apresentam comportamento tipicamente não newtoniano. Medições de viscosidade de fluidos não newtonianos não podem ser reduzidas a um intervalo único de velocidade de deformação, tendo de ser recolhidos uma gama de valores de velocidade de deformação (s^{-1}) (Figura 14).

A viscosidade de um fluido reoespessante aumenta com o aumento da velocidade de deformação, sendo a farinha de amido de milho um exemplo alimentar típico. Esta quando é

dissolvida em água e agitada a uma velocidade baixa adquire um aspeto leitoso, mas quando agitada a maiores velocidades, adquire um comportamento de líquido muito viscoso.

A viscosidade de um fluido reofluidificante tem um comportamento oposto, sendo que com o aumento da velocidade de deformação aplicada, a viscosidade tende a diminuir. A bebida à base de soro de leite é um exemplo deste tipo de fluido.

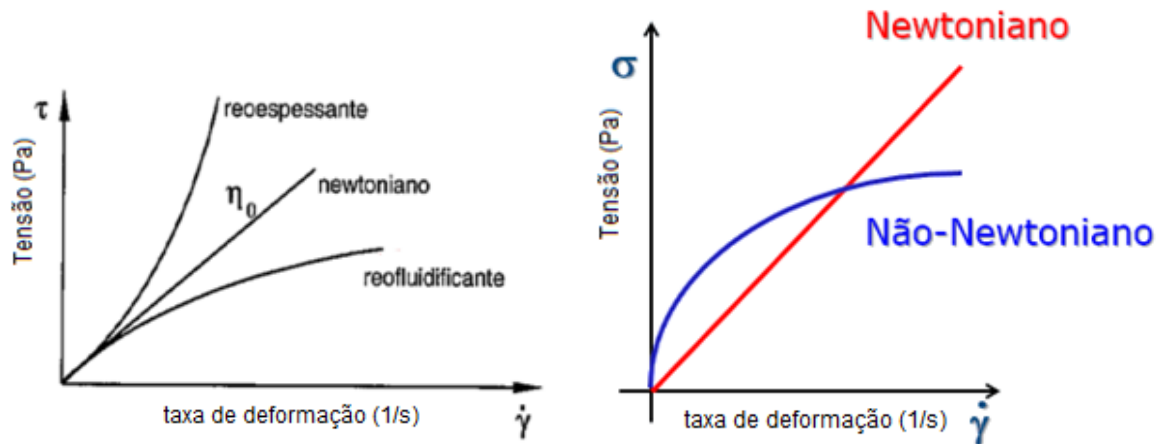


Figura 14. Comparação das curvas de escoamento de fluidos em relação ao aumento da velocidade de deformação ($\dot{\gamma}$). Existem dois desvios em relação ao comportamento newtoniano, dados por um comportamento reoespessante ($n > 1$) e reofluidificante ($n < 1$). Adaptado de (Castro *et al.*, 2001).

Os fluidos com um comportamento reofluidificante, apresentam variação da viscosidade de acordo com a velocidade de deformação aplicada (Figura 15). Para baixas velocidades de deformação, denominadas de Zona I na figura, o fluido apresenta um comportamento de viscosidade constante. Na zona II, para velocidades de deformação intermédias, apresenta um comportamento reofluidificante, ou seja, cuja viscosidade diminui com a velocidade de deformação. Para melhor descrever o comportamento do fluido, recorre-se à Lei da Potência. Por fim, para maiores velocidades de deformação, verifica-se novamente um comportamento newtoniano, ou seja, viscosidade constante.

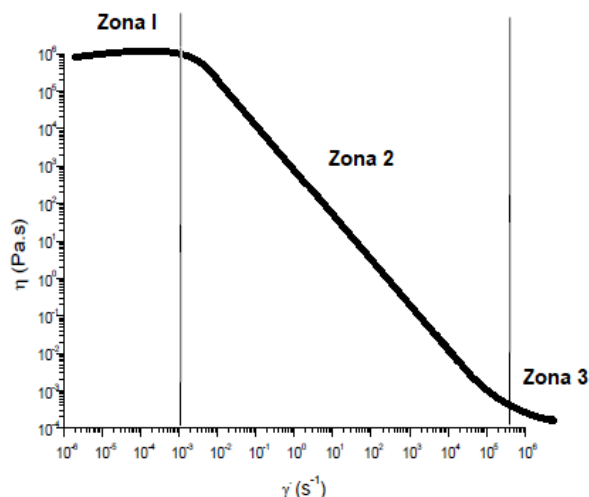


Figura 15. Comportamento reofluidificante de acordo com a respetiva velocidade de deformação aplicada.

Modelos reológicos para determinação da viscosidade

A forma como os materiais reagem às forças aplicadas e às deformações depende da estrutura interna dos materiais (Barnes *et al.*, 1989). De modo a caracterizar o comportamento da viscosidade dos materiais, existem modelos matemáticos capazes de se ajustarem às curvas de viscosidade, válidos em zonas bem definidas de velocidade de deformação, sendo o modelo a utilizar inteiramente dependente do tipo de material em estudo (Barnes *et al.*, 1989). Estes modelos são de extrema importância, uma vez que descrevem a forma geral da curva de fluxo num intervalo amplo de velocidades de deformação. Na Figura 12 associam-se os três modelos mais comuns para a descrição de diferentes zonas da curva de viscosidade.

A Lei de Potência (ou o Modelo de Ostwald–de Waele) é a que apresenta uma utilização mais simples, mas apenas é adequada para a zona reofluidificante. Ou seja, não descreve os patamares newtonianos. Caso se pretenda descrever a curva em toda a gama de velocidades de deformação, este modelo terá a sua utilização limitada, devendo recorrer-se a outros modelos, como o Modelo de Cross (Figura 16).

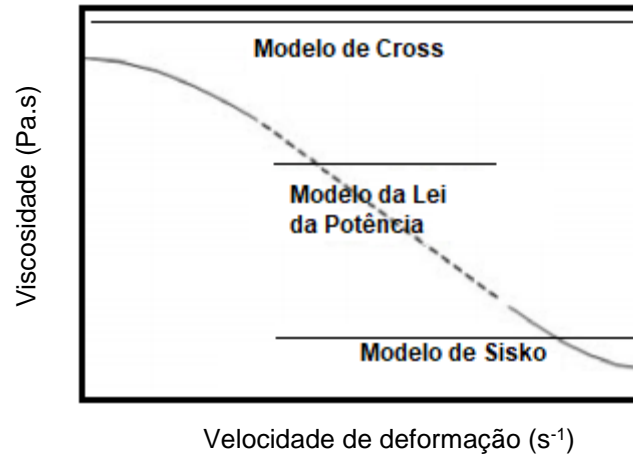


Figura 16. Representações do Modelo de Cross, do Modelo da Lei da Potência (também denominado Ostwald-de Waele) e do Modelo de Sisko que caracterizam o comportamento dos fluidos consoante a velocidade de deformação exercida (em s⁻¹). Adaptado de Carrilho (2014).

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \frac{1}{1 + (\dot{\gamma})^n} \quad (2)$$

Em termos de modelos reológicos, segundo o modelo de Cross (equação 2), o comportamento de uma solução é dado por cinco parâmetros que ajudam a caracterizar a viscosidade η_0 designa a viscosidade para um valor de velocidade de deformação limite, ou seja, o valor de viscosidade máxima no 1º patamar newtoniano. É uma propriedade crítica dos materiais para avaliar a estabilidade de suspensões e emulsões, estimar a massa molecular de polímeros e verificar mudanças a nível do processamento e diferentes formulações incorporadas (School of Rheology, 2016). η_{∞} é a viscosidade a uma velocidade de deformação “infinita”, ou seja, quando a velocidade de deformação é tão elevada que se atinge um segundo patamar newtoniano (Zona 3) (Figura 15). É indicadora do comportamento do material quando sujeito a forte processamento, nomeadamente quando sofre cortes. O parâmetro n , adimensional, designa a constante de Cross. É uma medida do grau de dependência da viscosidade sobre a velocidade de deformação na região reofluidificante. Valores nulos designam comportamento newtoniano e valores elevados indicam um comportamento cada vez mais reofluidificante. $\dot{\gamma}$ designa a velocidade de deformação (s⁻¹) aplicada num dado momento (School of Rheology, 2016). Os fluidos com aproximação ao modelo de Cross tendem para um valor de viscosidade nula (School of Rheology, 2016).

No contexto de alimentos funcionais, a bebida de soro de leite é inovadora uma vez que utiliza uma variedade de soro de leite de proveniência única na qual já se observou um potencial inibidor de inflamações considerável. Também poderá apresentar um potencial antitumoral uma vez que tem a capacidade de inibir a atividade das gelatinases MMP-2 e

MMP-9. Este produto alimentar apresenta um carácter inovador em termos de incorporação de produtos, uma vez que utiliza farinhas pouco exploradas (alfarroba e de bolota de azinheira) numa tentativa de valorização de produtos nacionais. É de extrema importância valorizar os nutrientes em falta no soro (e.g. gordura), daí optar-se por produtos que complementem a bebida. A construção faseada do produto encontra-se esquematizada em “2.1.2. Materiais utilizados na formulação da bebida”.

Objetivos

O objetivo principal do presente trabalho é a formulação de um produto alimentar que mantenha um carácter bioativo observado *in vitro*, de um soro de leite específico com adição de um ou mais elementos secundários que confirmem sabor, valor nutricional (na forma de vitaminas e ácidos orgânicos) (e.g. polpas de fruta, café ou farinhas) e que contemplem o aproveitamento de um subproduto da indústria alimentar. Em suma, pretende-se tornar o soro de leite fermentado apetecível em forma de um produto alimentar pronto a consumir. O carácter funcional (ou bioativo do produto) é exercido na redução da atividade de enzimas inflamatórias e pode ser caracterizado por vários métodos. Um deles envolve a taxa de migração celular de células de adenocarcinoma do cólon (HT29).

Numa etapa *a priori* da preparação da bebida, pretende-se otimizar a bioatividade do soro, concentrando num menor volume, maior quantidade de péptidos que exerçam efeito bioativo. Para tal, são considerados vários processos de concentração do soro após a etapa de fermentação. O soro foi submetido a uma fervura de 100 °C durante 15 minutos e filtrado. Aos 100 °C as proteínas do soro são desnaturadas e os péptidos não. Outra parte do soro fermentado foi liofilizado e ressuscitado num volume cinco vezes menor. Estes processos de concentração foram escolhidos em detrimento de outros de maior complexidade uma vez que são amplamente utilizados na indústria alimentar.

Em termos de bioatividade e nível enzimático também se pretende avaliar a percentagem de inibição de MMP-2 e MMP-9 de cada amostra, através de métodos fluorimétricos. Estes ensaios apresentam um carácter de complementaridade face aos de migração celular.

Para o desenvolvimento do presente trabalho foi utilizado o mesmo protocolo que estabeleceram Santos e colaboradores (2015) para a fermentação de soro de leite industrial, com uma mistura de bactérias lácticas mesófilas, no espaço de seis dias a 37 °C. Esta fermentação do SL serve também como uma estratégia de modo a obterem-se péptidos com propriedades funcionais benéficas.

De modo a tornar mais apetecível e rica nutricionalmente a bebida, procuraram-se matérias-primas complementares capazes de conferir aroma e sabor ao soro de leite e

mascararem a acidez das bactérias lácticas, uma vez que a presença destas bactérias prejudica diretamente a qualidade do produto (Pescuma *et al.*, 2010). A escolha destes sabores ou aromas pretendem estar ligados, se possível, a produtos nacionais de modo a promover a sua valorização.

Este produto alimentar seria de baixo custo, à base de SL concentrado (por liofilização ou *spray drying*). Pretende-se que esta bebida mantenha um carácter de bioatividade (anti-inflamatória) em produto final, ou seja, que após as etapas de adição de ingredientes e etapas de processamento a que é sujeita (*e.g.* tratamentos térmico) se verifique esta capacidade *in vitro*.

Finda a concretização deste produto, também se pretende avaliar a bebida (e respetivos ingredientes adicionados) em termos de parâmetros físico-químicos e reológicos, monitorizando o tempo de vida útil, ou seja, o período durante o qual o produto conservado e manipulado, nas condições pré-definidas, “mantém íntegras todas as suas características originais de qualidade e segurança” (Ragaert *et al.*, 2007).

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Caracterização do soro utilizado

Trabalhos anteriormente realizados nos nossos laboratórios permitiram produzir, por meio de uma fermentação do soro do leite, um péptido bioativo com uma atividade anti-inflamatória considerável. O trabalho apresentado nesta dissertação, foi realizado utilizando o referido soro fermentado. Por questões de confidencialidade, não será revelado o modo de produção desta bioatividade nem a empresa que forneceu o soro de leite.

Este soro foi previamente refrigerado e diluído numa proporção de 1:2 com água destilada de modo a controlar a quantidade de lactose no soro, para permitir a ocorrência de fenómenos fermentativos. Posteriormente, o SL foi fermentado em estufa (Binder C 150, Alemanha), a 37 ± 1 °C ao longo de seis dias, segundo o método padronizado por Santos e colaboradores (2015) em relação ao soro de leite da mesma empresa. Foram preparadas várias amostras de modo a efetuar ensaios posteriores relativos a parâmetros físico-químicos, funcionais e reológicos.

Para a produção do queijo que deu origem ao soro, foi adicionado um *starter* bacteriano (Danisco, Sassenage, França) de bactérias produtoras de ácido láctico (LAB) (Santos *et al.* 2015). As amostras de soro foram refrigeradas a 4°C e posteriormente acondicionadas a -18°C para análises quando fosse necessário.

Para otimizar a bioatividade do soro foram considerados vários processos de concentração do soro. O soro fermentado líquido foi submetido a uma fervura de 100 °C durante 15 minutos de modo a concentrar os péptidos numa quantidade pequena e filtrado com um filtro Whatman n^o 1 (SFF). Aos 100 °C as proteínas do soro são desnaturadas e os péptidos não. Outra parte do soro fermentado foi liofilizado e ressuscitado num volume cinco vezes menor (SFC). Foi considerada também uma amostra em que o SL apenas tinha sido fermentado, sem qualquer tratamento para concentrar os péptidos (SF). O soro não fermentado (SNF) foi considerado como o controlo para todos os ensaios, uma vez que sem fermentação não existe produção dos péptidos considerados.

2.1.2. Materiais utilizados na formulação da bebida

Os ingredientes adicionados ao soro de leite foram selecionados de acordo com a acessibilidade, custo e compatibilidade com bebidas lácteas.

O desenvolvimento do produto final passou por quatro fases distintas até se verificar uma melhoria considerável a nível sensorial e tecnológico. Encontram-se essas fases e a proveniência das respetivas matérias-primas:

- 1º. Adição de polpas de abacaxi, morango e papaia (Brasfrut, Brasil) à formulação;
- 2º. Adição de farinha de alfarroba biológica (BALF) (Próvida - Produtos Naturais, Lda, Sintra, Portugal) e farinha torrada de bolota (designação comercial de “Café de bolota”) (Herdade do Freixo do Meio, Portugal);
- 3º. Adição de mel (Mel D’Arrabida, Portugal) às bebidas com incorporação de farinhas;
- 4º. Adição de aromas (Sosa Ingredients, Espanha) (às bebidas de farinhas) que conferem sinergia do ponto de vista sensorial às bebidas finais (BALF e BBOL).

2.1.3. Polpas de fruta

Em termos de declaração nutricional, encontram-se representados os rótulos de cada polpa na Tabela 6.

Tabela 6. Declaração nutricional média por 100 g de polpa de abacaxi (*Ananas comosus* L.), polpa de morango (*Fragaria* L.) e polpa de papaia (*Carica papaya* L.), respetivamente.

	Abacaxi	Morango	Papaia
Valor energético	34 kcal / 143 kJ	33 kcal / 141 kJ	50 kcal / 212 kJ
Hidratos de carbono	7,8 g	6,8 g	11 g
Proteínas	0,5 g	0,9 g	0,8 g
Gordura total	0,1 g	0,3 g	0,1 g
Fibra alimentar	0,3 g	1,7 g	1,8 g
Sódio	1 mg	N.D.	3,0 mg
Magnésio	0,05 mg	N.D.	1,7 mg
Vitamina C	1,20 mg	64 mg	7,8 mg

2.1.4. Farinha de alfarroba e farinha de bolota

As farinhas foram adquiridas em supermercado local. Em termos de declaração nutricional, encontra-se representada a declaração nutricional da farinha de alfarroba na Tabela 7. A farinha de bolota torrada (designação comercial de “Café de Bolota”) não apresenta declaração nutricional expressa.

Tabela 7. Declaração nutricional média por 100 g de farinha de alfarroba biológica.

Energia	1254/ 300 KJ.kcal ⁻¹
Lípidos	0,65 g
Ácidos gordos saturados	0,09 g
Hidratos de carbono	49 g
Açúcares	40 g
Fibra	39,8 g
Proteínas	4,6 g
Sal	0,08 g

Para além dos ingredientes já referidos, também se adicionou carbonato de cálcio que teve apenas um papel de correção de pH e a goma xantana (Sigma Aldrich, EUA) que foi utilizada de forma a conferir melhor textura e evitar separação de fases que se verificou ocorrer 24 h após conservação.

2.2. Métodos

Os métodos utilizados no desenvolvimento da bebida de soro seguem três fases consecutivas:

- I. Ensaio preliminar para preparar soro com otimização de bioatividade, na qual se escolhe o melhor processo para obter um soro que contenha o potencial bioativo encontrado anteriormente sem ter de se isolar os péptidos. Com esta finalidade, utilizou-se o soro na sua diluição normal, um soro liofilizado e um soro sujeito a um processo de fervura e filtração (este último de forma a desnaturar a proteína do soro e assim concentrar os péptidos);
- II. Preparação da bebida onde se dá ênfase ao desenvolvimento da mesma com adição de elementos nutritivos (de modo a obter-se um produto sensorialmente adequado) e às etapas que englobam a formulação de uma bebida alimentar (ensaios reológicos e físico-químicos);
- III. Validação do potencial bioativo da bebida final, onde se comprova o potencial anti-inflamatório da formulação final (*in vitro*).

I - Ensaio preliminar para preparar soro com otimização de bioatividade

Quantificação de proteína (Método de Bradford)

De modo a verificar o efeito bioativo das várias amostras de SL e colocar a mesma quantidade de proteína para o ensaio de migração celular, quantificou-se a proteína das amostras (por $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Como padrão foi preparada uma reta de calibração com uma solução de BSA (Sigma-Aldrich, EUA), contendo 0; 2,5; 5; 15; 25 e 30 μg de proteína. Utilizou-se o método de Bradford para quantificação de proteínas por espectrofotometria (Bradford, 1976). Utilizaram-se diferentes concentrações conhecidas (0; 2,5; 5; 7,5 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de uma solução de albumina de soro bovina) 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para realizar uma reta padrão. Em cada poço foram pipetados 200 μL de reagente Bradford e 20 μL de amostra, ou padrões, em triplicado. Posteriormente, foi realizada a leitura da absorvância a 595 nm num espectrofotómetro Synergy HT (Bio-TEK). Os resultados foram processados no *software* K4 (Synergy HT, Bio-Tek Instruments, EUA).

Análise do perfil proteico por SDS-PAGE

As amostras foram previamente tratadas com tampão de amostra desnaturante e redutor (SBR). Este é composto por Tris-HCl 80 mM (pH = 6,8), β -mercaptoetanol 100 mM (Sigma-Aldrich, EUA), 2 % (m/v) de SDS, 15 % (v/v) de glicerol (Panreac, Espanha). Seguidamente foram centrifugadas a 1000 g durante 15 m à temperatura ambiente (VWR Hitachi Koki Co, Ltd, Japão). Foi utilizado o método de eletroforese vertical a 100 V e 20 mA segundo o método definido por Laemmli (1970).

A eletroforese em gel de poliacrilamida é uma técnica baseada na separação de moléculas de acordo com a sua massa molecular. As moléculas que apresentam menor massa molecular migram mais rapidamente face às de maior massa molecular, após aplicação de uma diferença de potencial (Laemmli, 1970). De modo a analisar o perfil proteico das amostras de SL utilizou-se uma técnica de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida em sistema descontínuo (Laemmli, 1970). O gel de separação foi elaborado com 15 % de acrilamida (glicerol a 85 %), 0,1 % (m/v) de bisacrilamida, 375 mM de Tris-HCl a pH 8,8, 7,73 % (v/v) de água Mili-Q, 0,033 % (m/v) de persulfato de amónio (PSA) e 0,1 % de TEMED. O gel de concentração a 5 % (m/v) de acrilamida foi elaborado com 0,13 % de bisacrilamida, 130 mM de Tris-HCl a pH 6,8, 57,6 % de água Mili-Q, 0,1 % (m/v) de PSA e 0,3 % (v/v) de TEMED.

Após corrida, os géis de SDS-PAGE foram tratados com TCA 10 % (v/v) durante 20 min sob agitação a temperatura ambiente e corados a 0,25 % de Comassie R-250 (m/v), 25 % de 2-propanol (v/v) e 10 % de ácido acético (v/v). A descoloração utilizou uma solução de 25 %

de 2-propanol (v/v) e 10% de ácido acético (v/v). O marcador utilizado para a eletroforese foi o m-cresol púrpura.

Ensaio fluorimétrico *DQ-Gelatin*

De modo a efetuar-se a quantificação da atividade inibidora do soro de leite nestas duas enzimas, procedeu-se a um ensaio fluorimétrico. Este ensaio utilizou o *kit DQ Gelatin*[®] (Thermo Fisher Scientific, EUA). A gelatina DQ foi diluída em água bidestilada de modo a obter a concentração final de 1 mg.mL⁻¹. Utilizou-se um tampão de ensaio a 50 mM Tris HCl pH = 7,6, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,01 % (v/v) de Tween 20. A concentração final de gelatina foi de 2,5 µg.mL⁻¹.

O ensaio é efetuado em microplacas de 96 poços, pretas e em cada poço foram adicionados 40 µL de MMP-9 ou MMP-2 com uma concentração de 0,1 mM. O objetivo do ensaio é testar o efeito inibitório da amostra. A emissão foi efetuada a 530 nm e a de excitação a 485 nm no espectrofotómetro Synergy HT (Bio-TEK). Colocou-se a placa a incubar em estufa (Sheldon Mfg. Inc., EUA) a 37 °C e a 5 % de CO₂ durante 1h. Adicionaram-se 100 µL de gelatina DQ e a placa foi de novo incubada nas condições referidas. Este método baseia-se na reação de proteólise que liberta produtos de clivagem que apresentam fluorescência. O substrato, *DQ Gelatin*, apresenta a capacidade de emitir fluorescência quando é degradado.

II – Preparação da bebida

Concentração do soro por *spray drying* e liofilização

De modo a concentrar o soro de leite, utilizou-se um *spray dryer* LabPlant SD-06 (Keison Products, Reino Unido) com um caudal de 3,3 mL.min⁻¹. A pressão utilizada a nível do compressor (*nozzle*) foi de 1,7 bar e a agulha apresentou um diâmetro de 0,5 mm. As temperaturas utilizadas foram respetivamente 160 °C e de 140 °C, de modo a utilizar condições de teste definidas por Barbosa e Teixeira (2017).

A etapa de liofilização foi feita com recurso a um liofilizador (Edwards Modulyo[®]). A amostra teve de ser previamente congelada a -18°C e o tubo tem de ser perfurado de modo à água constituinte da amostra poder sublimar.

II – Preparação da bebida

Adição de SL às bebidas

Para a preparação da bebida à base de soro de leite foi tido em consideração um modo de preparação sugerido por Pescuma e colaboradores (2010) referente a uma bebida de concentrado proteico de soro com sumo de pêsego com algumas modificações em termos de ingredientes adicionados, correção do pH e modo de conservação. Utilizou-se SL fermentado nas condições otimizadas por Santos e colaboradores (2015), de modo a incorporar péptidos bioativos. Utilizou-se carbonato de cálcio em vez de lactato de cálcio de modo a corrigir o pH da bebida e em vez de sumo de pêsego, utilizaram-se polpas líquidas de abacaxi, morango e papaia.

Preparação da bebida de SL com adição de polpas de fruta congeladas

Começou por se pesar para uma embalagem de vidro previamente esterilizada soro de leite liofilizado (15 %), polpa de abacaxi, morango ou papaia (7 %) (consoante a bebida), açúcar em pó e água (Figura 17). O produto conta com a adição de soro liofilizado na proporção de 14 % dado que é o valor mínimo que apresenta manutenção da bioatividade observada *in vitro*. A percentagem de polpa e açúcar adicionado foi estimada tendo em vista uma apreciação sensorialmente agradável. Segue-se uma breve etapa de mistura de modo a promover a solubilização dos ingredientes. Ocorreu homogeneização em agitador T 25 Basic (Ultra-Turrax®, Sigma Aldrich, EUA) (a T = 25°C e a uma frequência de 6000 min⁻¹).

De modo a fazer ajustamento do pH de um valor extremamente baixo para um valor “aceitável”, adicionou-se carbonato de cálcio que é permitido pela legislação portuguesa sob o (Regulamento (CE) No 1333, 2008) na proporção de *quantum satis* (o mínimo necessário). Em etapa final, o produto foi conservado até 5 °C.

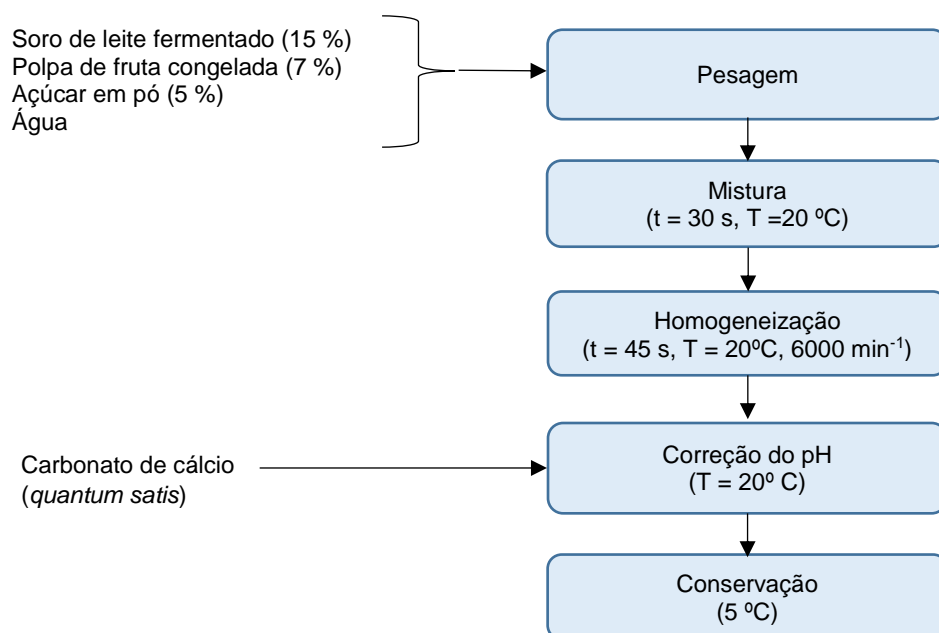


Figura 17. Fluxograma representativo das etapas de preparação das bebidas de abacaxi (BABA), morango (BMOR) e papaia (BPAP).

Preparação da bebida de SL com adição de farinhas pouco exploradas

Utilizaram-se etapas equivalentes à preparação das bebidas com polpas de fruta (Figura 17) mas efetuou-se uma correção do pH para 4,6, com sucesso, em ambas as bebidas (Figura 18).

Seguidamente foi adicionado 0,2 % de goma xantana (Sigma-Aldrich, EUA) a cada diferente formulação da bebida, de modo a evitar a separação de fases do produto aquando da fase de conservação final. A etapa de aquecimento que se segue apresenta diferenças significativas na consistência de ambas as bebidas, tornando-as mais fluidas. A etapa final é a conservação a 5 °C.

Esta formulação foi efetuada em colaboração direta com a empresa Cooking.LAB®, de modo a tornar o produto sensorialmente agradável, procurando efetuar poucas alterações de processamento para manter o caráter bioativo dos péptidos que a bebida contém.

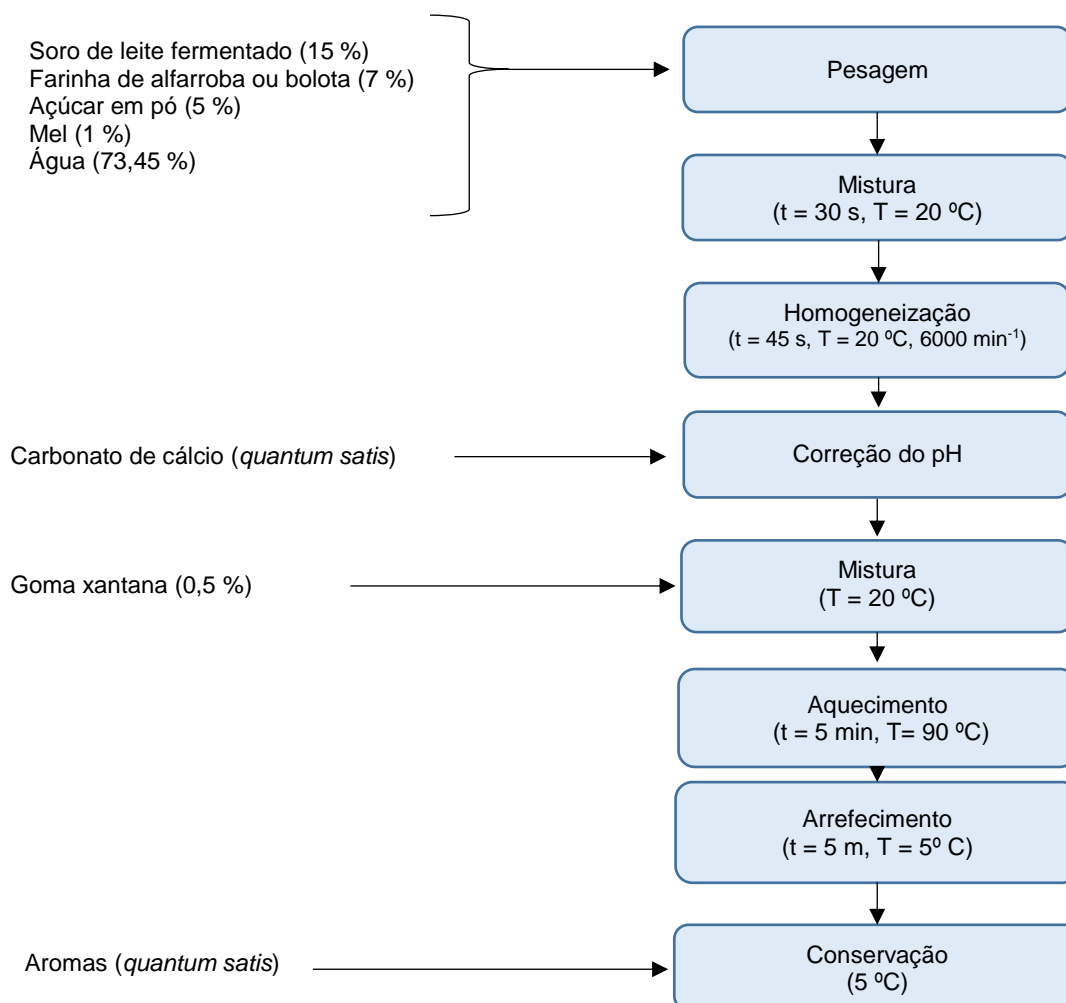


Figura 18. Fluxograma representativo das etapas de preparação das bebidas de alfarroba (BALF) e de bolota (BBOL).

Ensaio físico-químico

Foram realizadas análises que melhor caracterizam o SL (humidade, pH, proteína e cinza) e polpa de fruta (humidade, pH, cinza e acidez). A caracterização físico-química das matérias-primas foi efetuada de acordo com as normas portuguesas em vigor (no caso da cinza e acidez) e com a metodologia AOAC (*Association of Official Analytical Chemistry*) (no caso do extrato seco e humidade).

Extrato seco total

Entende-se por extrato seco total, a perda de peso sofrida pela amostra quando seca entre 100 e 105 °C, até peso constante. Recorreu-se à metodologia AOAC (1998) para tal. A determinação foi feita recorrendo a uma estufa elétrica (Binder C 150, Alemanha).

Cinza

Entende-se por cinza todo o resíduo obtido submetendo a amostra a uma temperatura de 550 °C.± 25 °C até combustão completa da matéria orgânica e obtenção de um resíduo de coloração branca (NP 477, 1983). As amostras, foram colocadas em estufa (Binder C 150, Alemanha) até atingirem massa constante. Posteriormente, foram colocadas em mufla (Heraeus, Alemanha). Utilizaram-se as amostras provenientes do ensaio de extrato seco descritas em “II. Extrato seco total”.

Acidez

A acidez é definida como sendo “o volume de solução alcalina normal, expresso em cm³ necessário para neutralizar 100 cm³ do produto líquido ou 100 g quando este for sólido ou pastoso” (Norma Portuguesa 1421, 1997). Para as amostras presentes, caracterizou-se a acidez das polpas de fruta congeladas segundo a NP 1427:1997, para géneros alimentícios “derivados de frutos e produtos hortícolas”.

pH

As medições de pH foram efetuadas em potenciómetro pH Basic 20 (Crison Instruments, Espanha) após calibração, à temperatura ambiente. Estas medições tiveram a regularidade de sete dias de modo a monitorizar o pH dos produtos.

Avaliação de viscosidade

A viscosidade das bebidas desenvolvidas foi avaliada em sala climatizada à temperatura constante de 20 °C. A determinação foi realizada com um sistema de pratos paralelos serrados de diâmetro 35 mm ($\varnothing = 35$ mm), num reómetro de tensão controlada HAAKE Mars RS-75 (Alemanha, Europa) à temperatura programada de $5,00 \pm 2,00$ °C. O *gap* utilizado (distância entre prato e a sonda) foi de 1 mm. Os ensaios tiveram a duração de 825 s e efetuaram-se a $5 \pm 2,00$ °C. A velocidade de deformação utilizada variou entre 1×10^{-8} a 500 s⁻¹.

Desenho experimental

As quantidades relativas de cada ingrediente utilizadas na formulação final encontram-se resumidas na Tabela 8, onde se evidencia o planeamento experimental utilizado. Na etapa final de desenvolvimento, adicionaram-se aromas. Estes aromas foram também adicionados

respeitando a proporção de *quantum satis* e corresponderam, em todas as amostras, de 1 a 2 mL.

Tabela 8. Quantificação dos ingredientes utilizados em diferentes formulações com 7,5 % de farinha de alfarroba e 7,5 % de farinha de bolota. A bebida de SL fermentada apresenta uma percentagem ou de 0,2 % ou 0,5 % de goma xantana (E 451) (em g).

	BALF 0,2 % XANT	BALF 0,5 % XANT	BBOL 0,2 % XANT	BBOL 0,5 % XANT
Soro de leite	2,100	2,100	2,100	2,100
Farinha	1,095	1,050	1,095	1,050
Açúcar	0,750	0,750	0,750	0,750
Água	11,025	11,025	11,025	11,025
Goma xantana	0,030	0,075	0,030	0,075

III – Validação do potencial bioativo do soro e da bebida final

Análise da capacidade de inibição de invasão tumoral

Manutenção das células HT29

A capacidade das células tumorais migrarem após efetuar-se um corte numa monocamada de células é indicadora da capacidade de formação de metástases num indivíduo (Lavilla-Alonso *et al.*, 2011). As células HT29 são células provenientes de um tumor primário do cólon de uma mulher caucasiana de 44 anos. As células foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10 % (v/v) de soro bovino fetal (SBF) previamente inativado pela fervura, 200 mM de glutamina (aminoácido responsável pelo crescimento celular), 250 µL de anfotericina (efeito antifúngico), 250 µL de penicilina e estreptomicina (efeito antibiótico). A linha celular foi mantida a 37 °C e a 5 % (v/v) de CO₂.

Ensaio de migração celular

Realizou-se uma etapa prévia de tripsinização da monocamada das células HT29 (Sanches, 2015). Seguidamente, as células foram colocadas a crescer em placas de 24 poços (com uma densidade de aproximadamente 5 x 10⁵ células/poço) até atingirem, um valor de confluência de 80 %.

Efetuuou-se um corte na monocamada das células (*wound healing essay*), com a ponta de uma micropipeta, sendo que esta etapa pretende simular uma ferida, separando a camada celular. Após trocar o meio dos poços foram adicionadas as amostras, na concentração de 100 µg.mL⁻¹. Mediu-se a largura do corte às 0 horas com o auxílio de um microscópio invertido e mediu-se o fecho do corte passadas 48 horas, uma vez que as células apresentam a tendência para invadirem o espaço vazio.

Ensaio de proliferação celular

O ensaio de proliferação celular das células HT29 é avaliado com base no método colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich; EUA). Em células viáveis, certas enzimas são capazes de reduzir o MTT para um composto insolúvel de cor púrpura. As células HT29 foram colocadas com uma densidade aproximada de 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços e incubadas com diluições sucessivas das amostras com potencial inibitório. Após um período de 24 h, foram adicionados a cada poço 100 μ L de uma solução de MTT em meio de cultura. As placas foram incubadas a 37 °C durante 4 h de modo a ocorrer a reação entre as enzimas e o substrato. Ao fim deste tempo foi colocado um solvente, dimetilsulfóxido, de forma a ocorrer solubilização dos cristais de MTT. Após 15 m de reação no escuro foi lida a absorvância a 570 nm em espectrofotómetro com recurso ao *software* K5 (Synergy HT, Bio-Tek).

IV - Tratamento estatístico

Todos os resultados experimentais foram analisados pelo menos em triplicado e expressos em médias associadas a um desvio padrão (DP). O nível de significância foi dado por 95 % para cada parâmetro avaliado. Um *p-value* inferior a 0,05 foi considerado como sendo significativo. A análise estatística foi realizada por análise de variâncias a um fator (ANOVA). Para o efeito de tratamento estatístico, utilizou-se o software IBM® SPSS® Statistics Versão 24 (IBM Corporation, EUA).

3. Resultados e Discussão

I – Ensaio preliminar para preparar soro com otimização de bioatividade

Análise do perfil proteico (SDS-PAGE)

No perfil de eletroforese (Figura 19), encontram-se representadas duas colunas: uma à esquerda com os pesos moleculares (em kilo Dalton, kDa) de acordo com o marcador molecular e outra, no topo, que é correspondente a cada amostra.

As amostras de soro que sofreram fermentação (SF e SFF) apresentam uma intensidade menor a nível das bandas (quando comparadas com o SNF) o que, segundo Sanches (2015), pode traduzir um ataque proteolítico às várias frações proteicas do soro pelas bactérias produtoras de ácido láctico (BAL). No soro não fermentado observam-se proteínas de peso molecular compreendido entre os 25 e os 150 kDa: (lactoferrina (80 kDa), albumina do soro (BSA) (66,5 kDa), imunoglobulinas (150 kDa) devido a este não ter sido fermentado e não ter sofrido ataques proteolíticos. Nos 66 kDa e nos 80 kDa podem observar-se bandas correspondentes respetivamente à BSA e lactoferrina, tal como foi encontrado por Sanches (2015). O mesmo não se verifica no soro fermentado e do soro fermentado e fervido, em que a maioria das proteínas foi degradada pelo consórcio bacteriano. Apesar de não se verificarem diferenças nas intensidades das bandas nas proteínas com peso molecular abaixo de 20 kDa, verifica-se que em todas as amostras existe a presença de proteínas alergénicas e estas não foram desnaturadas com o tratamento térmico aplicado (soro fermentado fervido).

Comparando as intensidades, a banda compreendida entre os 50 e os 75 kDa parece corresponder a maior quantidade de BSA do que lactoferrina. A banda que seria representante da ALA apresenta 14 kDa de peso molecular enquanto que a da BLG apresenta 18 kDa.

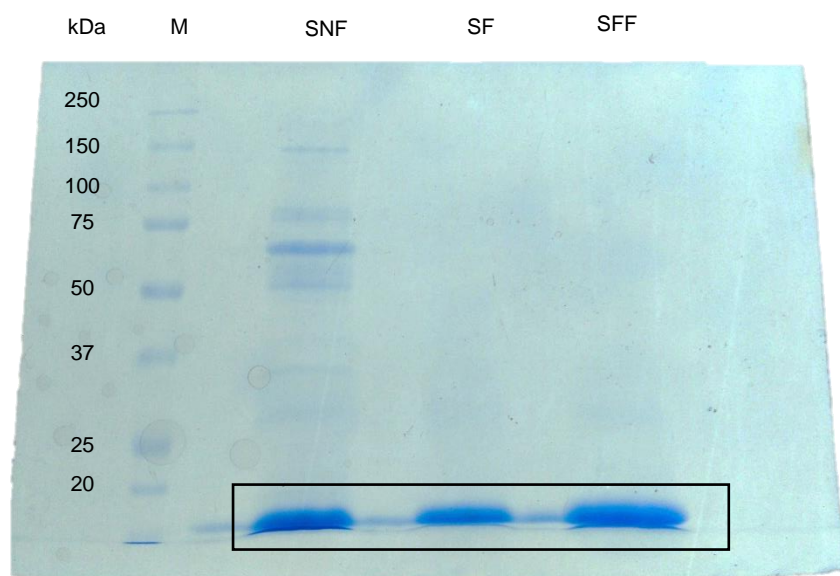


Figura 19. Perfil polipeptídico das frações proteicas de amostras de soro de leite de mistura obtido por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida (15 % (m/v) acrilamida), suplementado com 10 % (v/v) glicerol. A fração de SF foi submetido a um *cut-off* de 3 kDa. Em destaque, encontram-se representados péptidos cuja massa molecular é inferior ao último marcador considerado de 20 kDa, encontrando-se identificados na Figura 20 Legenda: M – Marcador de massa molecular (m-cresol púrpura); SNF – Soro Não Fermentado; SF – Soro Fermentado e SFF - Soro Fermentado e Fervido.

O gel da Figura 20 permite visualizar as bandas de fragmentos proteicos de menores dimensões, que poderão corresponder aos péptidos formados durante a fermentação ao longo do período considerado por Santos e colaboradores (2015). O consórcio bacteriano utilizado para a fermentação do soro de leite de mistura, origina “a formação e acumulação de péptidos derivados da degradação parcial das proteínas de maiores dimensões” (Sanches, 2015).

A finalidade do gel de SDS era visualizar se com a fermentação se as proteínas alergénicas ALA e BLG ficariam desnaturadas, uma mais-valia no produto alimentar uma vez que intolerantes a estas frações proteicas podiam ingerir a bebida. Tal não se verificou uma vez que o gel da Figura 20 parece indicar que tanto a ALA como a BLG se encontram abundantemente no soro fermentado. Sanches (2015) já tinha verificado que a banda de massa molecular referente a estas proteínas era visível no 6^o dia de fermentação.

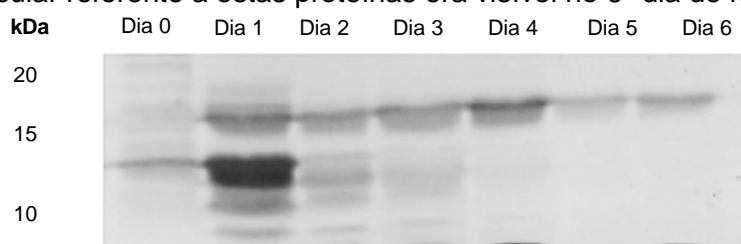


Figura 20. Perfil polipeptídico obtido por SDS-PAGE (17,5 % m/v acrilamida; suplementado com 10 % (v/v) glicerol) ilustrativo da evolução das frações proteicas com massas moleculares compreendidas entre os 3 e os 10 kDa durante a fermentação do soro de leite. Adaptado de Sanches (2015).

Inibição da capacidade de invasão tumoral

Os ensaios de migração relativos às diferentes frações de soro encontram-se representados na Figura 21. Foram observadas as células HT29 em microscópio invertido e tiradas fotografias em zonas demarcadas do corte das células HT29 antes da colocação das amostras ($t = 0$ h) e após ($t = 48$ h).

Quanto menor for o fecho do corte da monocamada de células HT29, maior será o efeito inibitório que o soro de leite oferece, resultante da bioatividade que possui. Em termos de caracterização da migração celular das amostras de soro e das bebidas, temos a análise respetiva na Figura 22. É possível verificar que existe uma diferença no nível de invasão celular entre os vários tratamentos que se fez ao soro e, também, em relação ao controlo, isto é, ao fecho completo da monocamada.

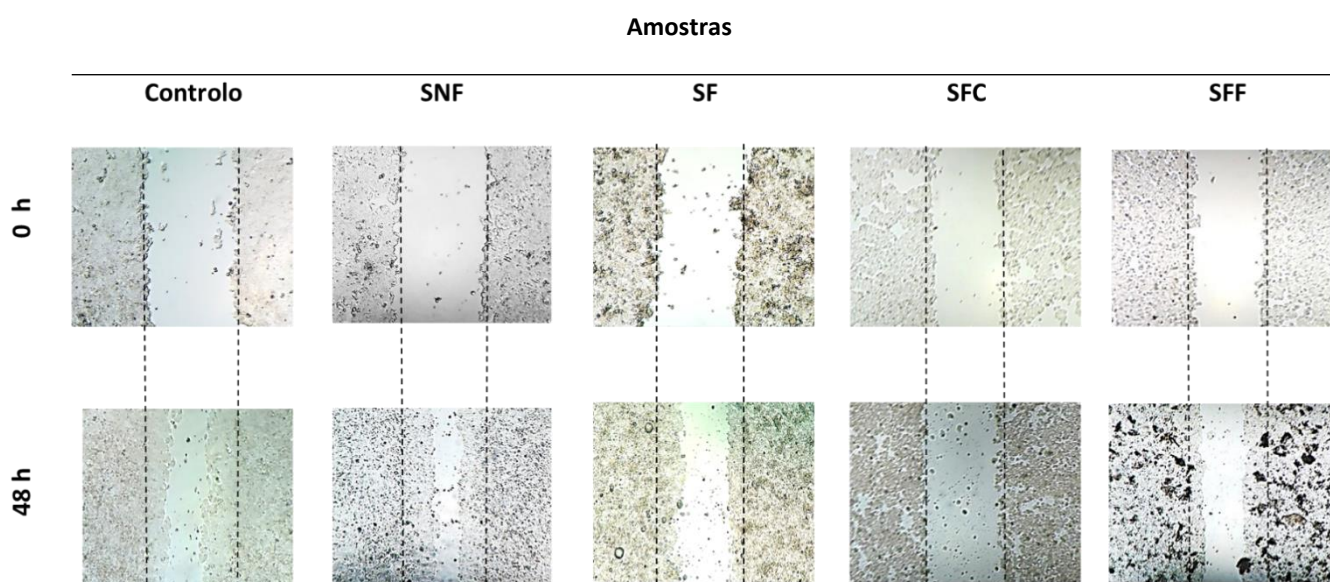


Figura 21. Exemplos representativos de ensaios de migração celular. Respetivamente, da esquerda para a direita: Controlo (corresponde ao fecho completo da monocamada), amostra de soro não fermentado (SNF), amostra de soro fermentado seis dias (SF), amostra de soro concentrado (SFC) e amostra de soro fermentado e fervido (SFF) após terem sido colocados 100 μ g de soro de leite de vaca, ovelha e cabra. Efetuou-se um corte na monocamada das células HT29 (0 h) e mediu-se a capacidade de as células fecharem o corte na mesma zona demarcada (após 48 h). Esta capacidade é verificada por medição da distância entre os extremos do corte. As linhas a picotado das 0 h e 48 h auxiliam a medição destes extremos.

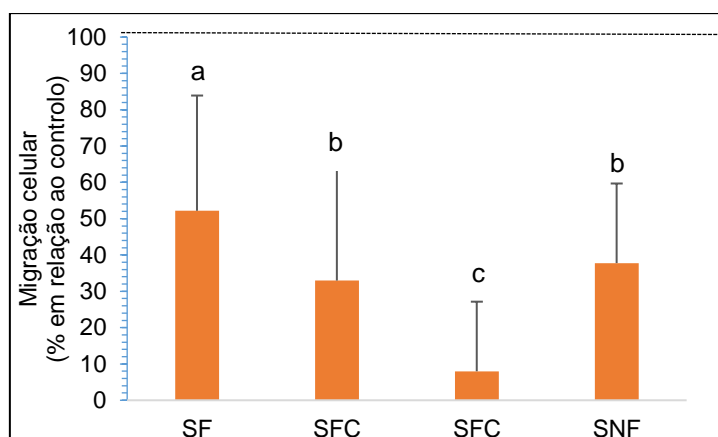


Figura 22. Percentagem de invasão celular, em relação ao controlo (dado por 100 %), ou seja, fecho completo do corte de células HT29 (n = 9). SF refere-se a “Soro Fermentado”, SFF a “Soro Fermentado e Fervido”, SFC a “Soro Fermentado e Concentrado” e SNF a “Soro Não Fermentado”. Os resultados encontram-se representados pela média \pm desvio padrão (DP). Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

A amostra de SFC, ou seja, a concentrada com recurso a liofilização foi a mais bioativa do ponto de vista anti-inflamatório pelo que foi a utilizada na incorporação das bebidas. Os resultados foram coincidentes com os observados por Sanches (2015) em que se verificou que o soro de leite parece ter uma atividade inibitória na invasão celular e que esta pode ser atribuída à formação de péptidos bioativos. De modo a complementar este estudo de bioatividade atribuída ao soro de leite, são necessários ensaios complementares: um ensaio de fluorescência com *DQ-Gelatin*. Estes dois ensaios podem indicar claramente que o efeito bioativo se deve à inibição das metaloproteinases de matriz.

Inibição da atividade das gelatinases (MMP-9 e MMP-2)

Ensaio fluorimétrico *DQ-Gelatin*

A capacidade das várias frações de soro (soro fermentado, soro fermentado concentrado e soro fermentado fervido) para a inibição da atividade das gelatinases, MMP-2 e MMP-9 foi analisada, através de um ensaio fluorométrico (Figura 23).

A capacidade de inibição das gelatinases baseia-se numa reação de proteólise realizada pelas gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9), utilizando como substrato a gelatina DQ. Quando há degradação do substrato, este apresenta fluorescência intrínseca. Este método permite avaliar a atividade gelatinolítica e, deste modo, a inibição direta de um composto nas gelatinases. Em amostras que se verifiquem menores valores de absorvância, existirá (em média) menor atividade gelatinolítica o que poderá ser indicativo do potencial bioativo antitumoral.

Todos as frações apresentam diferenças significativas em relação ao controlo sendo que a fração do soro fermentado e concentrado e do soro fermentado e fervido apresentam maior capacidade de inibição por concentrarem em menor volume uma maior quantidade de péptidos com efeito bioativo. Esta concentração advém do facto das amostras de soro terem sido submetidas a processos de concentração da proteína tanto pela liofilização como pela fervura (respetivamente no soro fermentado e concentrado e no soro fermentado e fervido).

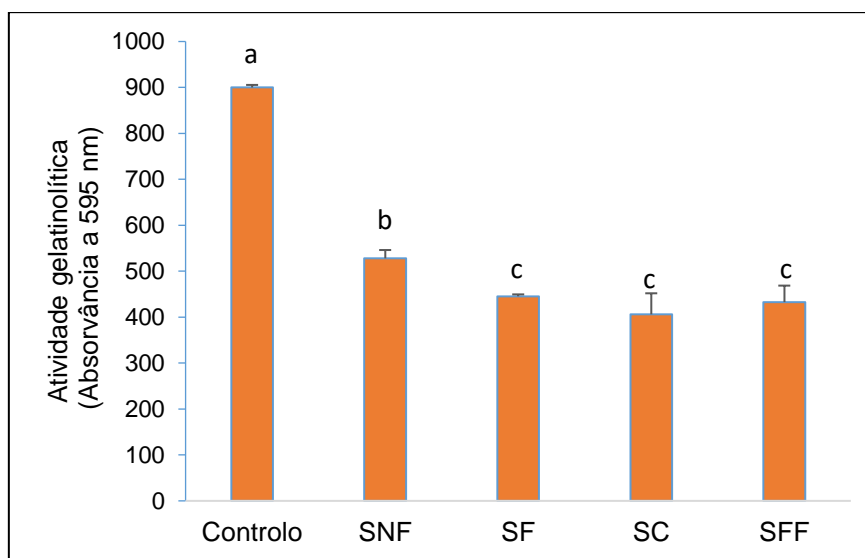


Figura 23. Inibição da atividade gelatinolítica das MMPs (MMP-2 e MMP-9) na presença das amostras de SNF (soro não fermentado), SF (soro fermentado), SF (soro concentrado) e SFF (soro fermentado e fervido). Os valores são apresentados em média \pm DP. Diferenças letras representam valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Após testar as bioatividades dos diferentes tratamentos do soro, escolheu-se a concentração por liofilização porque era a que dava melhores resultados em termos de inibição das metaloproteinasas de matriz, verificando-se uma inibição em 50 % da atividade gelatinolítica sendo que esta se encontra estritamente ligada à inibição tumoral. Trabalhos anteriores não conseguiram este grau de inibição para a MMP-2 ou MMP-9 (Sanches, 2015), pelo que este SL se destacou em termos do potencial anti-inflamatório.

II – Preparação da bebida

Concentração do soro de leite por *spray drying* e liofilização

No processo de *spray drying*, para o caudal e temperaturas aplicados o rendimento obtido foi muito reduzido. Este intervalo de temperaturas não permitiu a obtenção eficaz de SL fermentado em pó em quantidade apreciável. Tais dificuldades foram verificadas por acumulação de soro no ciclone (Figura 12). As altas temperaturas potenciaram reações de caramelização da lactose, apesar da alta temperatura ser determinante para aumentar o rendimento do processo. As proteínas são moléculas que podem sofrer mudanças estruturais durante a atomização, devido a fenómenos de desnaturação, agregação (Wijayanti *et al.*,

2014) e formação de complexos entre as proteínas do SL e as caseínas (Lourenço, 2014). As reações de caramelização aumentam a viscosidade do produto, o que impede a sua obtenção. O rendimento foi de apenas 0,15 % (para 140 °C) e 0,25 % (160 °C). A obtenção de SL numa quantidade significativa verifica-se apenas em grandes volumes, como acontece nas indústrias alimentares (Galsmar e Bergmann, 1967).

A liofilização, revelou ser uma opção mais rentável de obtenção de maiores massas de SL, apesar da obtenção de um concentrado com 25 % de humidade. O rendimento desta foi de 6 % resultante de diferença de peso entre a amostra com e sem humidade, obtendo-se, em média, 60 g.L⁻¹ de soro de leite em pó. Dado o rendimento ser substancialmente superior ao do soro obtido por *spray dryer*, optou-se pelo SL proveniente da liofilização para ser incorporado nas bebidas. Este tipo específico de soro obtido não apresenta características sensoriais agradáveis para consumo. Como tal, experimentaram-se diferentes estratégias para se obter uma bebida mais agradável. Entre estas encontram-se a adição de polpas de fruta e de farinhas como descrito detalhadamente em “2.1.2 Materiais utilizados na formulação da bebida”.

Contudo, é de salientar que o processo de liofilização tem custos elevados em termos industriais, pelo que numa fase de transferência de conhecimento a concentração do soro fermentado terá de ser alvo de estudo detalhado.

Caracterização das matérias-primas adicionadas à bebida

Avaliou-se a percentagem de resíduo seco total do soro e polpas de modo a compreender como é que a humidade influencia o tempo de vida útil do produto. Em relação aos valores de humidade dados por diferença de massa (diferença entre a massa inicial e final) a polpa de papaia apresentou maior teor de humidade, 89 %, seguida da de morango (84 %) e abacaxi (86 %).

O soro de leite liofilizado deveria apresentar um valor mínimo de humidade (inferior a 1 %), mas verificou-se que a liofilização não foi completamente eficaz na sublimação de água da amostra uma vez que esta apresentou 25 % de humidade. Os elevados resultados de humidade indicam o grau de pureza da constituição das polpas já que uma polpa por definição apresenta um teor de água desta ordem de grandeza (NP 1421, 1997). A acidez não foi avaliada no soro de leite uma vez que não se considerou um parâmetro fundamental na sua caracterização uma vez que esta é mascarada pela adição de aromas. Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros que melhor caracterizam o soro de leite fermentado e liofilizado e as polpas congeladas.

	Resíduo seco total (%)	Cinza (%)	Acidez
Soro de leite	75	1,43	N. D.
Polpa de abacaxi	14	1,77	13,87
Polpa de morango	6	1,83	12,53
Polpa de papaia	11	1,46	12,4

O soro de leite foi também analisado em relação à quantidade de resíduo calcinado (cinza) e verificou-se que apresenta uma percentagem média de 1,43 %, inferior ao encontrado por Silveira e colaboradores (2016). Em termos de pH (Tabela 10), o decréscimo associado (ao longo de 15 dias) do soro de leite atribui-se à produção de ácido láctico aquando dos processos fermentativos e adição deste às bebidas com polpa de fruta.

Pescuma e colaboradores (2010) observaram que com a adição de sumo de pêsego o pH diminuiu para 3,9 (face aos 2,9 obtidos) e que para aumentar este valor se teve de adicionar lactato de cálcio. As correções de pH procederam-se de modo semelhante, mas com adição de carbonato de cálcio (E 371). Este é permitido pela legislação europeia (Regulamento 1333, 2008) embora apenas seja dada a recomendação de *quantum satis* (ou seja, o mínimo necessário para atingir o efeito pretendido).

Nas bebidas com adição de polpa de fruta congelada não se conseguiram efetuar correções de pH provavelmente devido a adições de agentes antioxidantes que atuam como efeito tampão e impossibilitam que a adição de mais carbonato de cálcio aumente o pH. Já a bebida de alfarroba e bebida de bolota, a adição de carbonato de cálcio permitiu estabelecer um pH de 4,64 (Tabela 10). Este pH “aceitável” foi previamente utilizado e estabelecido por Almeida e colaboradores (2001).

Tabela 10. Variação de pH ao longo do tempo de armazenamento e respetiva temperatura de conservação (5°C durante 1 mês). t = 0 refere-se às medições de pH efetuadas após a preparação dos produtos. Medições de pH após conservação da bebida de morango (BMOR), bebida de papaia (BPAP) e bebida de abacaxi (BABA) não foram registadas dado a ineficácia de correção do pH para valores típicos de bebidas lácteas.

Produto	pH		
	t = 0	7 dias de conservação	15 dias de conservação
Soro de leite fermentado (SF)	3,32 ± 0,02	3,31 ± 0,02	3,30 ± 0,03
Bebida de Morango (BMOR)	2,87 ± 0,02	N. D.	N.D.
Bebida de Papaia (BPAP)	2,99 ± 0,02	N.D.	N.D.
Bebida de Abacaxi (BABA)	2,96 ± 0,02	N.D.	N.D.
Bebida de Alfarroba	2,96 ± 0,02	4,64 ± 0,02	4,74 ± 0,01
Bebida de Bolota	2,98 ± 0,02	4,66 ± 0,02	5,05 ± 0,01

Com o ajuste do pH a 4,6 que a bebida sofreu, existiu a formações de ligações cruzadas fortes de natureza iónica (visto que a um pH de 3,8 começa a existir formação de ligações cruzadas fortes de natureza iónica que afetam a viscosidade do sistema) (Luporini e Bretas, 2011).

Formulação das bebidas de SL

A utilização de polpas congeladas (Figura 24) apresenta inúmeras vantagens (nomeadamente no tempo de vida útil das matérias-primas, portabilidade, forte aroma associado). No entanto introduziram problemas no custo da matéria-prima por unidade de massa e problemas em corrigir o pH da bebida (provavelmente pela adição de compostos com efeito antioxidante que exercem efeito tampão, na formulação de origem, que impossibilitam o ajuste de pH).

Existiram também problemas a nível sensorial dado que as frutas utilizadas não apresentam sinergias com o “sabor amargo do soro de leite” (Pescuma *et al.*, 2010). Não se deu continuidade a esta linha de desenvolvimento de produtos dadas as dificuldades encontradas a nível sensorial e tecnológico.



Figura 24. Exemplo de produto acabado. Amostras de bebida de soro de leite com polpa de fruta congelada: de morango (esquerda) e de abacaxi (direita).

Caracterização reológica das bebidas de fruta

Na Figura 25 apresentam-se as curvas de viscosidade das bebidas de SL com polpa de fruta (morango e papaia), em comparação com um produto já comercializado (néctar com adição de polpa de fruta). As duas bebidas de soro de leite apresentam um perfil de variação da viscosidade, com a velocidade de deformação, muito semelhantes. As duas curvas são praticamente paralelas, apresentando um declive semelhante. De salientar que nos três casos estamos perante um comportamento reofluidificante, caracterizado por uma redução de viscosidade com a velocidade de deformação. Tal semelhança em termos de escoamento será traduzida por uma semelhança em termos de processamento e de percepção sensorial.

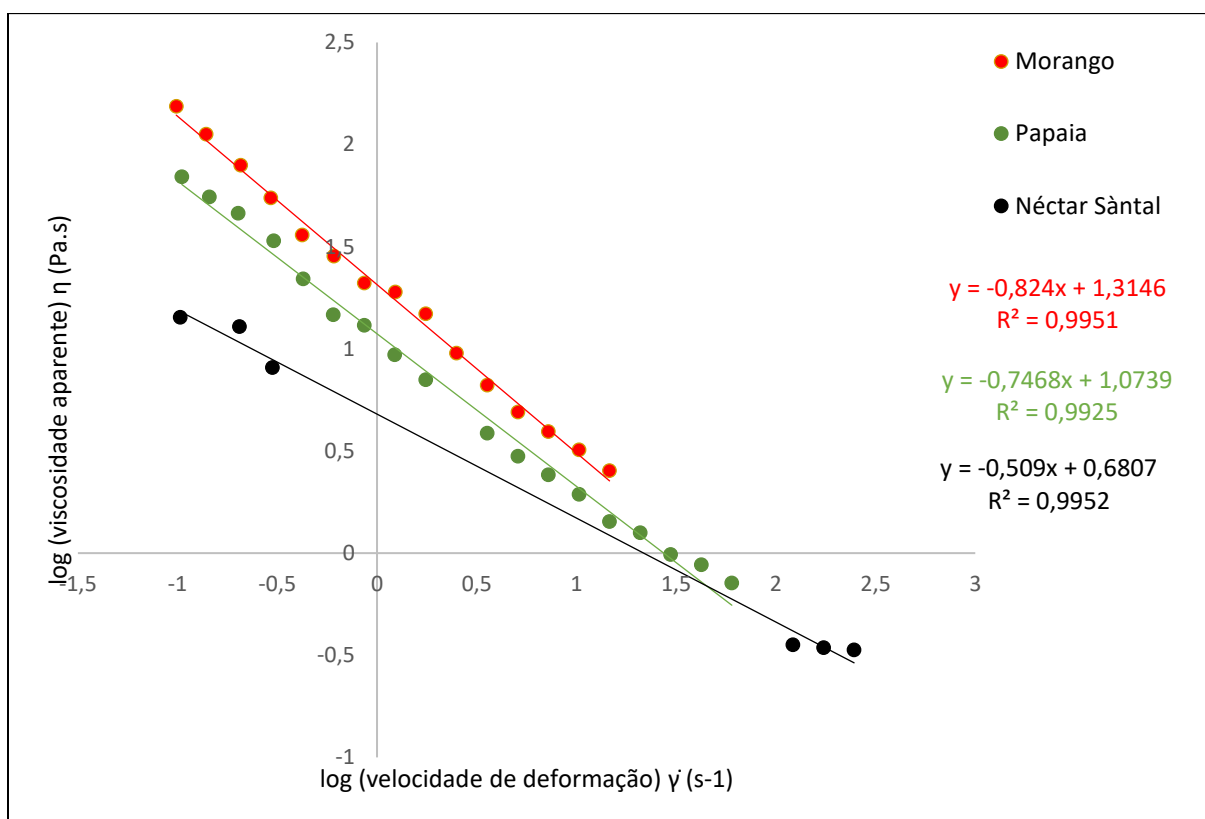


Figura 25. Curvas de viscosidade relativas à bebida de morango (laranja) e bebida de papaia (verde). Em comparação apresenta-se um produto comercial (néctar de pera) (preto).

As curvas de viscosidade representadas na Figura 24 têm uma zona reofluidificante bem definida e apenas no caso do néctar comercial, existe uma tendência para um patamar newtoniano, a elevadas velocidades de deformação. Assim, como aproximação, ajustou-se a Lei de Potência para descrever o comportamento da viscosidade das bebidas em função da velocidade de deformação.

A partir das curvas de viscosidade, é possível obter valores de n (índice de escoamento) e de K (índice de consistência), através da aplicação da Lei da Potência (equação 3):

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad (3)$$

Através da logaritmização desta equação, com $\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$ obtém-se que $\eta = K \dot{\gamma}^{n-1}$ pelo que (equação 4):

$$\log(\eta) = \log(K) + (n - 1) \log \dot{\gamma} \quad (4)$$

De onde vem que $\log(K)$ = ordenada na origem e $(n - 1)$ corresponde ao declive da reta.

Aplicando a equação da Lei de Potência às curvas de viscosidade representadas na Figura 24 obtêm-se os valores de K e n, para as bebidas de soro com incorporação de polpas, resumidas na Tabela 11.

Tabela 11. Índice de escoamento (n) e índice de consistência (K) para as bebidas de morango (BMOR) e papaia (BPAP) em comparação com uma bebida comercial (Néctar de Pera Santal).

	K (Pa.s ⁿ)	n
Bebida de Morango (BMOR)	20,635	0,176
Bebida de Papaia (BPAP)	11,855	0,253
Néctar de Pera Santal	4,794	0,491

Apesar da semelhança em termos de comportamento reológico, verifica-se que os índices de consistência e de escoamento das três bebidas apresentam diferenças apreciáveis. A bebida de morango é a mais consistente e com uma dependência mais acentuada da viscosidade com a velocidade de deformação, que se traduz por um valor de n mais afastado da unidade.

Verifica-se ainda que as bebidas com incorporação de polpa têm consistência muito superior à bebida comercial, mas tal facto não é limitativo, pois essa bebida apresenta um contexto de consumo diferente. Poderia ter-se considerado outra referência, como por exemplo um iogurte líquido, cuja consistência já seria superior. É de notar que a polpa de papaia tem a sua estabilidade afetada pela ação da enzima papaína, pelo que, face a aumentos de temperatura, podem existir oscilações do valor de consistência (Carvalho *et al.*, 2011).

Formulação das bebidas com farinha de alfarroba e farinha de bolota

De modo a ultrapassar as limitações sensoriais já referidas para as bebidas à base de polpas de fruta, procedeu-se ao estudo de bebidas com incorporação de farinha de bolota e de alfarroba. A farinha de alfarroba tem a composição resumida na Tabela 7.

As bebidas foram formuladas de acordo com o previsto na Tabela 8. No entanto, em ensaios preliminares verificou-se que a goma xantana numa concentração de 0,5 % (m/m) foi mais eficaz na prevenção da separação de fases (resultados empíricos não apresentados).

De acordo com o processamento das bebidas com incorporação de farinha, descrito na Figura 18 prevê-se uma etapa de tratamento térmico. Esse tratamento visa a promoção de uma desnaturação parcial das proteínas e a promoção das interações entre as proteínas e os polissacáridos, presentes nas farinhas em estudo, que ao formarem um gel fraco poderão aumentar a estabilidade física do produto. Para além disso, este tratamento também terá um impacto positivo em termos da conservação da bebida.

Caracterização reológica das bebidas de farinha

Na Figura 26 estão resumidas as curvas de viscosidade das bebidas de SL preparadas com farinha de alfarroba ou farinha de bolota, com e sem tratamento térmico. Todas as formulações apresentam 7,5 % de farinha de alfarroba ou de bolota, com 0,5 % (m/m) de goma xantana.

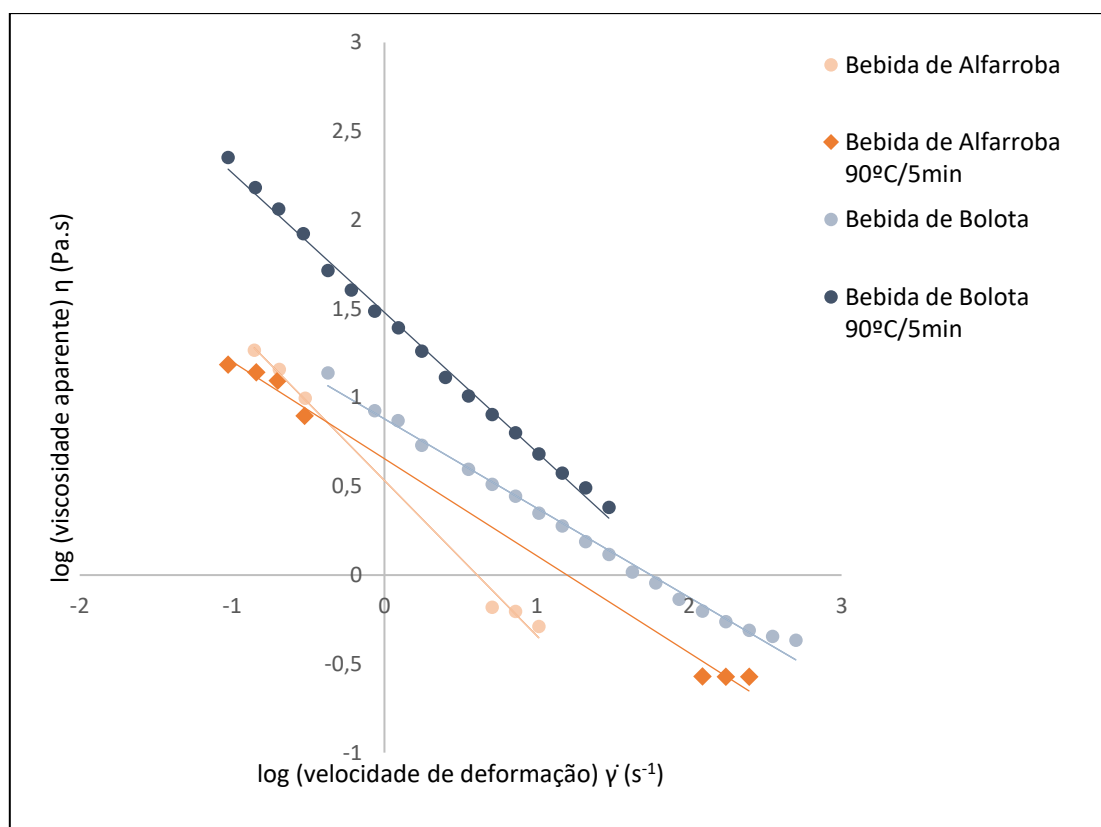


Figura 26. Curvas de viscosidade de bebidas de soro de leite com incorporação de farinha de alfarroba ou de bolota, com e sem tratamento térmico a 90°C durante 5 minutos.

A partir das curvas da Figura 26 determinaram-se os valores de K e de n, tal como efetuado anteriormente, que se encontram resumidos na Tabela 12.

Tabela 12. Índice de consistência (K) e de escoamento (n) para as bebidas soro de leite com incorporação de farinha de alfarroba ou de bolota, com e sem tratamento térmico. Todas as bebidas indicadas apresentam 0,5 % (m/m) de goma xantana.

	K (Pa.s ⁿ)	n
Bebida de Alfarroba (BALF)	3,409	0,126
Bebida de Alfarroba (BALF) com tratamento térmico	4,525	0,453
Bebida de Bolota	7,581	0,497
Bebida de Bolota (BBOL) com tratamento térmico	30,120	0,213

Relativamente ao índice de consistência (K) verifica-se que as bebidas à base de farinha de bolota apresentam valores superiores às bebidas preparadas com farinha de alfarroba. Tal facto resultará da composição em proteínas e polissacáridos de ambas as farinhas. No caso da farinha de bolota, apresenta um efeito mais estruturante.

O aspeto mais relevante do quadro anterior prende-se com o facto de a consistência da bebida aumentar de modo muito marcante com o tratamento térmico, para as duas farinhas. No caso da farinha de bolota, esse aumento foi notório e corresponde a 397 %.

Tal como se previa, o tratamento térmico contribuiu para um aumento da consistência das bebidas, que terá resultado do aumento do grau de estruturação das mesmas, consequência do aumento das interações entre as proteínas e os polissacáridos presentes nas farinhas e que foram promovidas pelo aumento da temperatura. De salientar que no caso da farinha de bolota, por ter maior concentração destas biomoléculas (nomeadamente amido) e as mesmas apresentarem grande complexidade e termossensibilidade (Rao *et al.*, 1997), esse aumento de consistência foi ainda mais evidente. Rao e colaboradores (1997) verificaram que o índice de consistência (K) durante o intumescimento de grânulos de amido encontrava-se relacionado com o diâmetro médio destes, que era função do aquecimento.

Em relação aos índices de escoamento (n) é difícil estabelecer uma relação com a composição da bebida e a realização, ou não, de tratamento térmico, evidenciando-se apenas que os valores de n obtidos são semelhantes aos encontrados para as bebidas com polpas de fruta.

Atendendo à necessidade de posicionar a bebida de soro de leite em desenvolvimento face a outros produtos existentes no mercado e que podem ser concorrentes em termos de

oportunidade de consumo (e.g. lanches ou como *snack*), procedeu-se à comparação da consistência das bebidas com farinhas de alfarroba e bolota com um néctar e um iogurte líquido Figura 27.

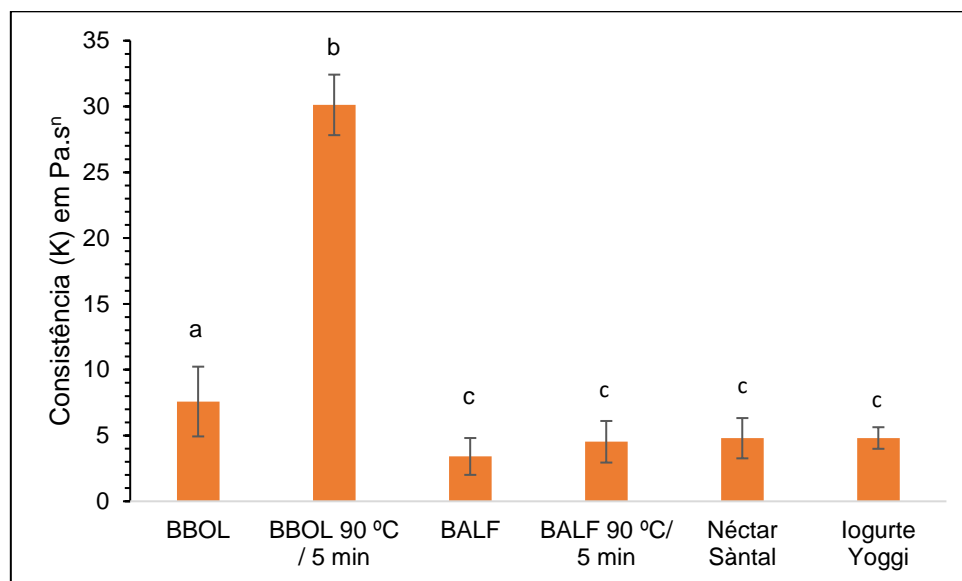


Figura 27. Consistência (K) (Pa.sⁿ) do ensaio das bebidas (5°C) em sala climatizada a 20°C de soro de leite com farinhas de alfarroba (BALF), bolota (BBOL), comparação com os tratamentos térmicos efetuados e comparação com bebidas comerciais. Os valores encontram-se representados pela média \pm desvio padrão (DP). Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

A partir da Figura 27 verifica-se que as bebidas com farinha de bolota, com e sem tratamento térmico, apresentam valores de índice de consistência significativamente superiores ($p > 0,05$) aos obtidos para as bebidas de alfarroba e para os produtos comerciais analisados. Tal facto, tal como já foi referido, resultará do maior teor proteico e de polissacáridos (e.g. amido em percentagens de 74 a 84 %) desta farinha (*Quercus ilex* L.) (Silva *et al.*, 2016). No entanto, verifica-se que as bebidas com farinha de alfarroba, com e sem tratamento térmico, apresentam valores de consistência que não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) dos obtidos para as bebidas comerciais.

Assim, é possível obter uma bebida à base de soro com consistência semelhante às bebidas comerciais utilizadas como referência, recorrendo à farinha de alfarroba. No entanto, se se optar pela incorporação de farinha de bolota, cujo interesse nutricional tem vindo a ser amplamente reconhecido (Silva *et al.*, 2016) terá de se ter em conta a questão da elevada viscosidade das bebidas resultantes. Nesse caso, ou se opta por produzir uma bebida mais consistente, que terá o seu enquadramento em termos de mercado, ou terá de se reduzir a concentração de farinha de bolota e eventualmente, de goma xantana.

Impacto da concentração da farinha na consistência das bebidas

Tendo em vista avaliar o impacto da concentração das farinhas utilizadas na consistência das bebidas de soro de leite, prepararam-se bebidas com incorporações crescentes de farinha de alfarroba e bolota. A comparação dos índices de consistência dessas bebidas, com os valores de K das bebidas comerciais, pode ser efetuada a partir da Figura 28, onde a linha a cheio representa o valor aproximado de K das bebidas comerciais (inferior a 5 Pa.sⁿ).

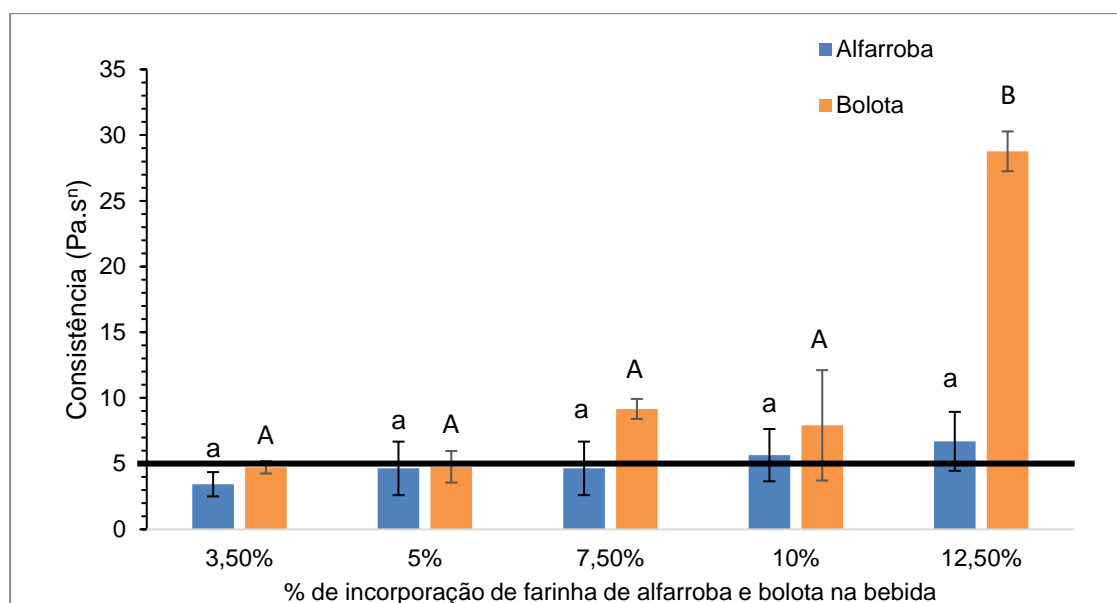


Figura 28. Variação do índice de consistência (K) com a concentração de farinha de alfarroba e de bolota. Os valores encontram-se representados pela média \pm desvio padrão (DP). Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$). A linha horizontal a cheio representa o valor aproximado de K dos produtos comerciais.

A partir da Figura 29 verifica-se que a consistência das bebidas com incorporação de farinha de alfarroba é menos sensível à variação da concentração de farinha do que as bebidas com incorporação de farinha de bolota. No caso da farinha de alfarroba, variando a concentração entre 3,5 % e 12,5 % (m/m) obtêm-se sempre valores de K próximos das bebidas comerciais tidas como alvo. No entanto, no caso da farinha de bolota, cujo índice de consistência varia de modo muito marcante com a concentração, verifica-se que para concentrações inferiores a 7,5 %, a consistência das bebidas é semelhante à dos produtos comerciais, tidos como referência. Contudo, acima de 5 % (m/m) a consistência das bebidas aumenta drasticamente.

Este tipo de informação é de extrema importância em termos de transferência de conhecimento para a indústria, pois, dependendo das especificações do produto comercial que se pretende obter, é possível ajustar a formulação, dando resposta num intervalo alargado de consistências.

Mais uma vez se salienta que o diferente tipo de comportamento observado por parte das duas farinhas resulta da diferente composição, nomeadamente em termos de proteínas e polissacáridos constituintes (Dickinson, 1999; Silva *et al.*, 2016). Todos os resultados de K e de n que caracterizam as curvas de viscosidade foram obtidos por aproximação à Lei de Potência, considerando para tal, apenas a zona reofluidificante das curvas. No entanto, pretendeu-se avaliar em que medida o ajuste da Equação de Cross poderia descrever de modo mais rigoroso o estudo efetuado. Assim, na Tabela 13 comparam-se os parâmetros do Modelo de Cross referentes às bebidas cujos valores de índice de consistência se apresentam na Figura 30, para diferentes concentrações de farinha.

Tabela 13. Ensaio referentes à bebida de SL com farinha de alfarroba (BALF) e BBOL (parâmetros da aproximação à equação de Cross e respetivo coeficiente de correlação, R^2). Legenda: η_0 : viscosidade limite do primeiro patamar newtoniano, η_∞ : viscosidade limite quando a velocidade de deformação é infinita, $\dot{\gamma}_b$: representa a velocidade de deformação crítica e m: constante de Cross.

	η_0	η_∞	$\dot{\gamma}_b$	n	R^2
BBOL 3,5 %	43.33	0.6220	0.1682	1.302	0,9888
BBOL 5 %	35.58	0.6373	0.2594	1.672	0,9938
BBOL 7,5 %	79.45	1.670	0.2729	2.299	0,9970
BBOL 10 %	83.07	1.342	0.2504	1.199	0,9986
BALF 3,5 %	20.25	0.7110	0.3475	1.218	0.9788
BALF 5 %	40.49	1.529	0.3155	2.286	0.9827
BALF 7,5 %	20.97	0.8333	0.3128	2.372	0.9855
BALF 10 %	50.58	2.652	0.4105	11.95	0.9454

A partir dos resultados da Tabela 13 verifica-se que os ajustes da Equação de Cross, neste tipo de bebidas, apresentam um coeficiente de correlação elevado (superior a 0,9), evidenciando a adequação do modelo. Para além disso, verifica-se que as bebidas com farinhas de bolota apresentam valores de viscosidade limite (η_0) do primeiro patamar newtoniano superiores às das bebidas com farinha de alfarroba.

Muito embora este tipo de tratamento possa ser considerado mais correto em termos reológicos, atendendo a que a zona reofluidificante de todas as bebidas estudadas está claramente definida e que os patamares newtonianos não são bem evidentes em todas as amostras, optou-se por recorrer sempre à Lei de Potência e comparar os valores em termos de K e de n.

Impacto da adição de goma xantana na consistência das bebidas

Nas formulações estudadas anteriormente em detalhe, utilizou-se uma concentração de goma xantana de 0,5 %, que foi a que em termos visuais permitiu minimizar a separação de fases. Contudo, tendo em vista perceber em que medida a consistência das bebidas desenvolvidas é sensível à variação deste espessante, prepararam-se também bebidas com concentrações de 0,20 e 0,35 % (m/m). Este estudo torna-se importante porque estamos perante bebidas cuja consistência poderá ter de ser reduzida, no sentido de se aproximar mais dos valores das bebidas comerciais. Para além disso, o custo dos hidrocolóides, nomeadamente da goma xantana é sempre considerável à escala industrial, pelo que uma formulação com teores inferiores de goma xantana poderá ser financeiramente mais favorável.

Na Figura 29 representa-se a variação do índice de consistência das bebidas com farinha de alfarroba e de bolota, com incorporação dos referidos teores de goma xantana.

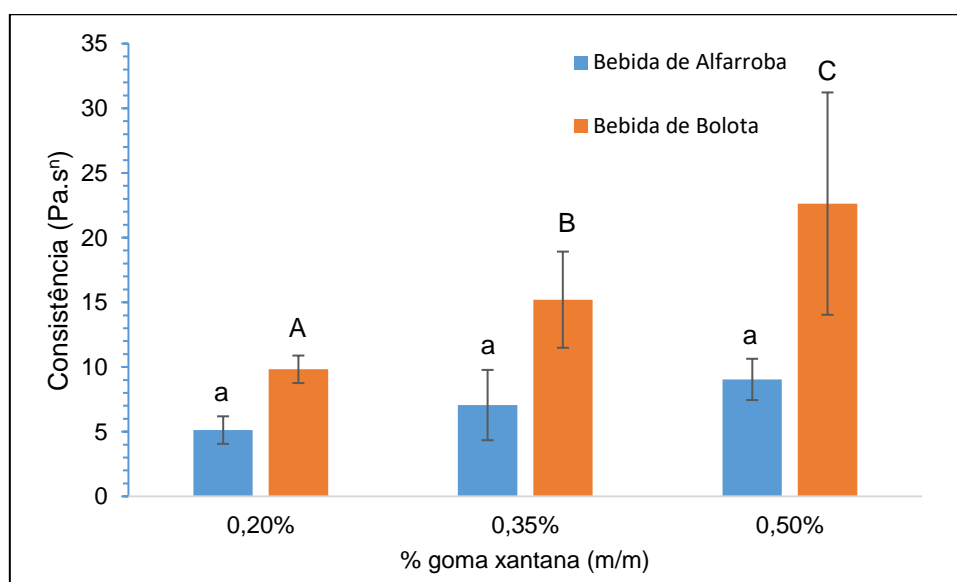


Figura 29. Variação do índice de consistência (K) das bebidas de soro de leite com incorporação de 7,5 % (m/m) de farinha de alfarroba e de farinha de bolota com diferentes teores de goma xantana. Letras minúsculas referem-se a valores de consistência da alfarroba estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas referem-se a valores de consistência da bolota estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

A partir da Figura 29 verifica-se que, no caso da farinha de alfarroba, a redução de concentração de goma xantana para 0,20 e 0,35 % não se traduz numa redução significativa ($p \leq 0,05$) da consistência na bebida. Tal facto deverá resultar da maior contribuição da farinha para a consistência da bebida do que da goma xantana, para estes níveis de incorporação. No entanto, em termos empíricos, observou-se que a concentração de 0,5 % é mais vantajosa na limitação da separação de fases. No caso das bebidas com farinha de bolota, apenas se observa uma redução significativa da consistência ($p \leq 0,05$) para o teor de goma de 0,2 %.

No entanto, essa concentração não permite minimizar totalmente separação de fases. A goma xantana permite aumentar significativamente a viscosidade de géneros alimentícios assim como uma separação de fases eficaz (Shao *et al.*, 2012), apesar de este estudo incidir em outro tipo de materiais (Boyd *et al.*, 2009). A viscosidade das soluções aumenta decididamente com o aumento da concentração da goma xantana. Tal comportamento pode ser atribuído a “interações intermoleculares e entrelaçamentos, devido ao acréscimo efetivo nas dimensões da macromolécula” assim como o próprio “peso molecular” do espessante (Garcia-Ochoa *et al.*, 2000).

Estas interações intermoleculares e entrelaçamentos, podem ser explicadas devido ao acréscimo efetivo nas dimensões da macromolécula no peso molecular (Garcia-Ochoa *et al.*, 2000). Em específico, em termos de bebidas derivadas do leite, existe uma preferência dos consumidores por produtos mais “encorpados” (Gomes e Penna, 2009), o que um espessante como a goma xantana permite conferir.

Formulação final

Em termos da formulação de um produto deste género, Holsinger e colaboradores (1974), desenvolveram uma bebida à base de soro, estável à temperatura ambiente durante pelo menos três meses. Constataram também que o aroma de soro é mais compatível com aromas provenientes de frutas cítricas, como a laranja, o maracujá ou o abacaxi pelo que se considerou a hipótese de adicionar polpas de fruta.

A adição de sacarose e de mel permitem atenuar a sensação de acidez e o sabor proveniente das bactérias produtoras de ácido láctico (BAL). A capacidade antimicrobiana do soro pode explicar o poder de conservação que apresenta.

Em termos sensoriais e funcionais, a utilização das percentagens de 15 % para soro, 7,5 % para a farinha, 5 % de sacarose, 1 % de mel, 0,5 % de goma xantana e 71 % de água revelou ser a melhor opção de preparação. Esta formulação tem como base a manutenção de bioatividade da amostra de soro de leite concentrado observada *in vitro*.

Aromatização

Após elaboração final da bebida, revelou-se necessário adicionar aromas com a finalidade de mascarar o sabor característico das bactérias produtoras de ácido láctico (BAL). Os aromas adicionados não tiveram nenhuma escolha subjacente, sendo escolhidos apenas numa lógica para conferir sinergias do ponto de vista sensorial. Em termos da bebida de alfarroba adicionaram-se aromas de café, erva-príncipe, chocolate amargo e avelã. Já em termos da

bebida de bolota adicionaram-se aromas de framboesa, erva-príncipe, avelã e concentrado de licor de café. Seguidamente, foi submetido a avaliação sensorial com discussão.

Avaliação sensorial com painel de discussão

A avaliação sensorial constitui uma etapa fundamental na aceitação de produtos alimentares. Para tal, foram colocadas amostras da bebida em copos numa quantidade passível de ser testada para avaliação sensorial (Tabela 14). Foram avaliados atributos em relação ao sabor, aroma e aparência das bebidas em painel não treinado. A análise sensorial foi feita no âmbito de um painel de discussão, formado por cinco elementos. Como tal, os resultados obtidos serão apenas indicativos sobre a aceitabilidade dos produtos.

A avaliação final em termos de sabor foi “bastante positiva” para todas as amostras. A bebida de bolota com adição de avelã e a bebida de alfarroba com adição de chocolate amargo revelaram uma aceitação unânime devido à sinergia que apresentam com a respetiva farinha. Serão estes os aromas a testar, em termos de continuação do trabalho.

Tabela 14. Representação de aromas utilizados na seleção das bebidas de SL com 7,5 % (m/m) de farinha de alfarroba e farinha de bolota.

Bebidas	Aromas			
Bebida de SL com farinha de alfarroba (BALF)	Aroma de chocolate amargo	Aroma de erva-príncipe (<i>Cymbopogon citratos</i> L.).	Concentrado de licor de café	Aroma de avelã
Bebida de SL com farinha de bolota (BBOL)	Aroma de framboesa	Aroma de erva-príncipe (<i>Cymbopogon citratos</i> L.).	Aroma de avelã	Concentrado de licor de café

III – Validação do potencial bioativo do soro e da bebida final

Em última etapa, pretendeu-se validar o carácter bioativo da bebida de SL verificando se o soro de leite na forma de bebida, após etapas de processamento retinha capacidade anti-inflamatória desejável. Os ensaios relativos ao potencial bioativo do soro de leite fermentado e da bebida foram distintos. No caso do soro isolado (“Ensaio preliminar para preparar soro com otimização de bioatividade”), recorreram-se a ensaios de migração celular e ensaios fluorimétricos. No caso das bebidas com soro de leite, recorrem-se a ensaios de migração celular e um ensaio de proliferação celular.

Análise da capacidade de inibição de invasão tumoral

Ensaio de migração celular das bebidas de SL com farinhas

O carácter bioativo das bebidas à base de soro de leite foi avaliado apenas com a adição de SL fermentado e concentrado às farinhas. Não se verificou o carácter bioativo em relação à adição de mel ou aromas, uma vez que não é do âmbito do presente trabalho o estudo do carácter bioativo eventualmente conferido por outros ingredientes. Em ambos os casos foram utilizados 15 % de SL, 7,5 % de cada farinha respetiva, 5 % de sacarose, 0,5 % de goma xantana e 71,3 % de água.

A adição de farinhas ao soro de leite concentrado teve um efeito adicional no que toca à inibição da migração das células HT29 Figura 30 como se pode ver no gráfico da Figura 31. Das bebidas testadas, a de adição com alfarroba mitigou a migração celular 80 %, sendo a que apresenta maior capacidade de inibição, sendo superior ao soro fermentado, quando isolado. Tal pode ser explicado por algum composto presente na farinha de alfarroba, possivelmente algum composto fenólico (que interfira na migração celular) (Yi *et al.*, 2005).

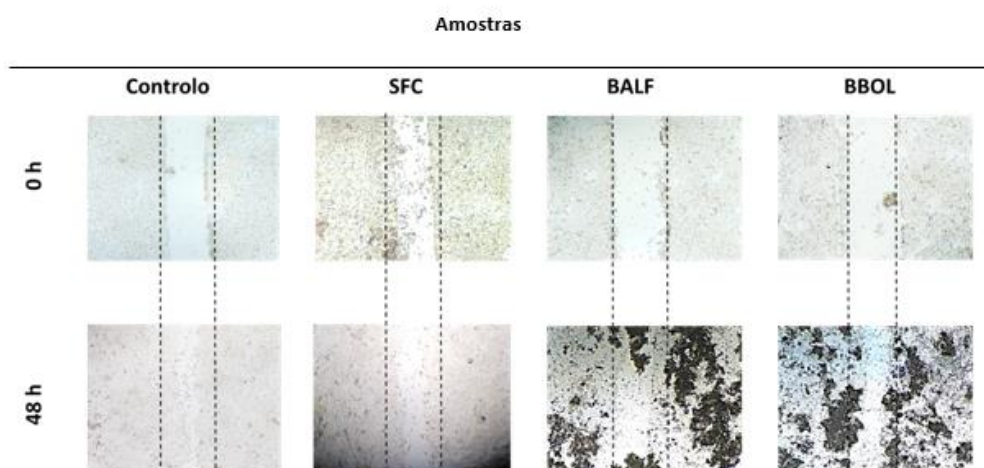


Figura 30. Exemplos representativos de ensaios de migração celular (na fração de soro fermentado seis dias e concentrado, bebida de soro de leite com alfarroba (BALF) e bebida de soro de leite com bolota (BBOL) após terem sido colocados 100 µg de amostras de soro de leite de vaca, ovelha e cabra. Efetuou-se um corte na monocamada das células HT29 (0h) e mediu-se a capacidade das células fecharem o corte (após 48h) numa zona previamente demarcada.

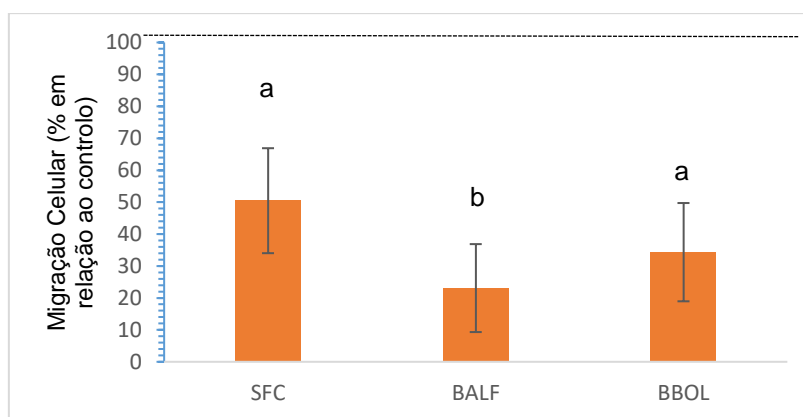


Figura 31. Percentagem de invasão celular, em relação ao controlo (dado por 100 %), ou seja, fecho completo do corte de células HT29 (n = 9). SFC refere-se ao SL fermentado e concentrado, BALF, à bebida de SL fermentado com alfarroba e BBOL à bebida de SL fermentada com bolota. Os resultados encontram-se representados pela média \pm desvio padrão (DP). Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Ensaio de proliferação celular

As concentrações mínimas inibitórias são definidas como a concentração mínima para manter ou reduzir a viabilidade de um inibidor. Estas foram determinadas de forma a verificar se o soro de leite inibia o crescimento celular e se induzia citotoxicidade, sendo este último um fenómeno indesejável nas células. A concentração mínima inibitória (CMI) que inibe 10 % do crescimento celular, determinadas para o soro (SFC), bebida de alfarroba (BALF) e bebida de bolota (BBOL) (Tabela 15), estudados, foram de 201,54, 20,91 e 11,89 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respetivamente. A bebida de bolota apresenta menor concentração sendo por isso a que inibe maior crescimento celular; tal pode ser explicado uma vez que pode apresentar compostos fenólicos, com efeitos de inibição de crescimento.

Um efeito inibidor da proliferação celular é desejável na medida em que intervém diretamente na terapêutica antitumoral, caso este seja seletivo para as células do cancro do cólon. Os resultados são indicativos que os valores das CMIs para ambas as bebidas desenvolvidas foram menores do que os valores das CMIs para o soro fermentado e concentrado. Isto sugere que os ingredientes adicionados aumentam a bioatividade do soro. Por isso, tanto a nível da invasão tumoral como da proliferação tumoral, as duas bebidas foram mais bioativas que o soro isolado sendo a da bolota mais eficaz.

Tabela 15. Concentração mínima inibitória (CMI) das bebidas de soro de leite com farinhas pouco exploradas (BALF e BBOL) e do soro de leite isolado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Bebida de Alfarroba (BALF)	20,91
Bebida de Bolota (BBOL)	11,89
Soro de Leite fermentado (SFC)	201,54

4. Conclusão

O desenvolvimento de uma bebida a partir de soro de leite enquadra-se numa ótica de economia circular, sendo que esta última preconiza benefícios sociais e socioeconómicos no longo prazo. Em geral, verificou-se um aproveitamento razoável deste subproduto, uma vez que 1 L de soro líquido fermentado apresentou um rendimento de 6 % na etapa de liofilização. Esta etapa permitiu concentrar eficazmente péptidos com efeito bioativo sem recorrer a outro tipo de processos industriais de maior complexidade (e.g. tecnologia de membranas). Em termos específicos, existe tanto valorização como aproveitamento de nutrientes provenientes do soro (e.g. elevado carácter proteico). A bebida de soro de leite aparece como um “produto inovador”, uma vez que reutiliza um soro de leite de uma determinada proveniência, na qual se observou anteriormente um considerável efeito anti-inflamatório e efeito potencialmente antitumoral.

Neste trabalho verifica-se o cumprimento do objetivo principal de elaboração de uma bebida à base de soro de leite, tendo sido possível contornar os problemas organoléticos característicos do soro de leite (e.g. aroma e sabor). Na forma do produto alimentar, não se provou que a fermentação do soro de leite constituísse uma ferramenta para contornar o problema da intolerância à lactose e da remoção de proteínas alergénicas, uma vez que a ALA e a BLG permaneceram no soro fermentado. Os resultados obtidos nos ensaios de migração celular são indicativos do potencial anti-inflamatório da bebida com soro de leite fermentado, corroborando investigações anteriores. A formulação final da bebida revelou-se “saborosa” uma vez que se revelou em painel sensorial que não se detetaram os defeitos associados ao sabor e aroma do ácido láctico produzido aquando da fermentação. O carácter bioativo inibidor das gelatinases (MMPs) foi mantido, apesar deste não ser indicativo se inibiu mais a MMP-2 ou a MMP-9. O soro de leite fermentado teve um efeito anti-inflamatório considerável uma vez que inibiu até 90 % a migração celular.

A formulação correspondente a 15 % para soro, 7,5 % para a farinha, 5 % de sacarose, 1 % de mel, 0,5 % de goma xantana e 71 % de água destilada revelou ser a melhor opção para atingir o objetivo pretendido. A adição de aromas foi uma importante estratégia para mascarar o aroma e sabor conferido pelas bactérias lácticas. A avaliação sensorial em painel de discussão favoreceu as bebidas com farinha de alfarroba com aroma de chocolate amargo e as bebidas com farinha de bolota com aroma de avelã.

Nas bebidas com incorporação das farinhas de alfarroba e bolota, verificou-se que houve maior inibição de migração celular do que aquela que se observou no soro, quando isolado, inibindo a migração celular em 90 %, apresentando este soro um potencial inibitório considerável.

A nível reológico, os resultados são indicadores que estamos perante produtos com viscosidade e comportamento reológico semelhantes a produtos já comercializados.

Em termos da concentração mínima inibitória (CMI), verificou-se que o soro de leite por si só não apresenta toxicidade uma vez que não houve uma diminuição significativa da viabilidade celular. A CMI foi indicadora de que para se obter o mesmo efeito anti-inflamatório *in vitro*, apenas é necessária uma concentração de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de SLC. No entanto, haveria a necessidade de se utilizarem modelos animais *a posteriori* para se confirmar o respetivo potencial bioativo.

Uma das grandes questões que fica por responder em termos de preparação deste tipo de bebidas passa por otimizar o processo de concentração do soro já que a liofilização utilizada no presente trabalho, dificilmente poderá ser utilizada à escala industrial.

Em ensaios futuros seria interessante testar concentrações superiores de soro de leite na bebida, já que uma das finalidades inerentes é escoar um subproduto de uma indústria alimentar e transformá-lo numa matéria-prima pronta a utilizar na incorporação de produtos alimentares. Também se deverão testar novas formulações de sabor, assim como a respetiva avaliação do carácter bioativo. A caracterização nutricional desta bebida é um dos tópicos que também deveria ser concretizado, de modo a avançar a bebida para uma escala industrial. Associada à formulação desta bebida, deveria existir uma análise sensorial por parte de um painel de provadores treinado.

O produto alimentar desenvolvido parece constituir uma aposta sólida na reutilização de um subproduto com capacidades funcionais, sendo imperativo um estudo de aceitação de mercado deste tipo de bebidas lácteas.

5. Referências bibliográficas

- Abreu, M.C., 2014. O potencial bioativo do soro de queijo após fermentação láctica. Universidade de Lisboa: Instituto Superior de Agronomia.
- Almeida, K.E. De, Bonassi, I.A., Roça, R.D.O., 2001. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo Minas Frescal. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 21, 187–192. doi:10.1590/S0101-20612001000200012
- Antonelli, J., Lindino, A., Rodrigues De Azevedo, J.C., Nelson, S., De Souza, M., Cremonez, P.A., Rossi, E., 2016. Biogas production by the anaerobic digestion of whey Produção de biogás por digestão anaeróbia do soro de leite. *Rev. Ciências Agrárias* 39, 463–467. doi:10.19084/RCA15087
- Arpagaus, C., Schafroth, N., Meuri, M., 2010. Laboratory Scale Spray Drying of Lactose: A Review. *Inf. Bull. Büchi Switz.* 1–12.
- Assadi, M.M., Abdolmaleki, F., Mokarrame, R.R., 2008. Application of whey in fermented beverage production using kefir starter culture. *Nutr. Food Sci.* 38, 121–127. doi:10.1108/00346650810862993
- Aydjn, S., Özdemir, Y., 2017. Development and Characterization of Carob Flour Based Functional Spread for Increasing Use as Nutritious Snack for Children. *J. Food Qual.* 2017, 7. doi:10.1155/2017/5028150
- Azevedo, L., Magro, F., Portela, F., Lago, P., Deus, J., Cotter, J., Cremers, M., Vieira, A., Peixe, P., Caldeira, P., Lopes, H., Gonçalves, R., Reis, J., Cravo, M., Barros, L., Ministro, P., Lurdes, M., Duarte, A., Campos, M., Costa-Pereira, A., 2010. Estimating the prevalence of inflammatory bowel disease in Portugal using a pharmaco-epidemiological approach, *Pharmacoepidemiology and drug safety.* doi:10.1002/pds.1930
- Baccouche, A., Ennouri, M., Felfoul, I., Attia, H., 2013. A physical stability study of whey-based prickly pear beverages. *Food Hydrocoll.* 33, 234–244. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.03.007
- Baldasso, C., 2011. Fracionamento dos Componentes do Soro de Leite através da Tecnologia de Separação por Membranas. Porto Alegre.
- Barbosa, J., Teixeira, P., 2017. Development of probiotic fruit juice powders by spray-drying: A review. *Food Rev. Int.* 33, 335–358. doi:10.1080/87559129.2016.1175016

- Barley, J., 2017. Basic Principles of Freeze Drying. SP Sci. URL <https://www.spscientific.com/freeze-drying-lyophilization-basics/> (Acedido a 15.11.17).
- Barnes, H.A., Hutton, J.F., Walters, K., 1989. An Introduction to Rheology, in: Viscosity. Elsevier Ltd, Amsterdam, pp. 11–22.
- Bellwood, P., 2005. The Beginnings of Agriculture in Southwest Asia First Farmers: The origins of agricultural societies., in: First Farmers: The Origins of Agricultural Societies.
- Blades, L., Morgan, K., Douglas, R., Glover, S., De Rosa, M., Cromie, T., Smyth, B., 2017. Circular Biogas-Based Economy in a Rural Agricultural Setting. Energy Procedia 123, 89–96. doi:10.1016/j.egypro.2017.07.255
- Blaskó, B., 2010. World Importance and Present Tendencies of Dairy Sector. Appl. Stud. Agribus. Commer. 5, 119–123.
- Bosi, M.G., Bernabé, B.M., Lucia, S.M. Della, Roberto, C.D., 2013. Bebida com adição de soro de leite e fibra alimentar prebiótica. Pesqui. Agropecu. Bras. 48, 339–341. doi:10.1590/S0100-204X2013000300013
- Boyd, M.J., Hampson, F.C., Jolliffe, I.G., Dettmar, P.W., Mitchell, J.R., Melia, C.D., 2009. Strand-like phase separation in mixtures of xanthan gum with anionic polyelectrolytes. Food Hydrocoll. 23, 2458–2467. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.07.008
- Božanić, R., Barukčić, I., Lisak, K., 2014. Possibilities of whey utilisation. Austin J. Nutr. Food Sci. 2, 1–7.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brandelli, A., Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F., 2015. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. Food Res. Int. 73, 149–161. doi:10.1016/j.foodres.2015.01.016
- Busti, C., Falcinelli, E., Momi, S., Gresele, P., 2010. Matrix metalloproteinases and peripheral arterial disease. Intern. Emerg. Med. 5, 13–25. doi:10.1007/s11739-009-0283-y
- Cambridge Econometrics, 2014. Modelling the economic and environmental impacts of change in raw material consumption.
- Carrilho, L.S.F.B., 2014. Bolachas sem glúten a partir de subprodutos da indústria. Instituto

Superior de Agronomia.

- Carvalho, A. de C., 2015. Estatísticas da Produção e Consumo de Leite (2015). Instituto Nacional de Estatística (INE), Lisboa.
- Carvalho, R., Junqueira, M., Pola, C., Teixeira, L., Carvalho, R., 2011. Efeito do processamento térmico na atividade da papaína e viscosidade do suco de mamão (*Carica papaya* L.). *Cent. Científico Conhecer* 7, 10–23.
- Castro, A.G., Covas, J.A., Diogo, A.C., 2001. Reologia e suas aplicações industriais 16-29-141.
- Cavadini, C., Siega-Riz, A.M., Popkin, B.M., 2000. US adolescent food intake trends from 1965 to 1996.[Erratum appears in *Arch Dis Child* 2002 Jul;87(1):85]. *Arch. Dis. Child.* 83, 18–24.
- Chavarro, J.E., Toth, T.L., Sadio, S.M., Hauser, R., 2008. Soy food and isoflavone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic. *J. Hum. Reprod.* 23, 2584–2590. doi:doi.org/10.1093/humrep/den243
- Comissão Europeia, 2016. A Economia Circular: Interligação, criação e conservação de valor. doi:10.2779/85279
- COMPETE, 2014. A inovação chega às bebidas fermentadas. Proj. FNA. Disponível em <http://www.pofc.qren.pt/media/noticias/entity/a-inovacao-chega-as-bebidas-fermentadas> (Acedido a 02.11.17).
- Cortez, A.P.B., Medeiros, L.C.D.S., Speridião, P.D.G.L., Mattar, R.H.G.M., Fagundes Neto, U., Morais, M.B. De, 2007. Conhecimento de pediatras e nutricionistas sobre o tratamento da alergia ao leite de vaca no lactente. *Rev. Paul. Pediatr.* 25, 106–113. doi:10.1590/S0103-05822007000200002
- Costa, D.C., 2011. Caracterização e tratamento de efluentes resultantes da actividade de produção de queijo. Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa.
- Costa, M. do R.L. da, Pintado, M.M.E., 2014. Development and characterization of new functional acorn beverage.
- Coussens, L.M., 2002. Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer--Trials and Tribulations. *Science* (80-.). 295, 2387–2392. doi:10.1126/science.1067100

- Cunha, T.M., Ilha, E., Amboni, R., Barreto, P., Castro, F., 2009. A influência do uso de soro de queijo e bactérias probióticas nas propriedades de bebidas lácteas fermentadas. *Brazilian J. Food Technol.* 12, 23–33. doi:10.4260/BJFT2009200800004
- Danaei, G., Finucane, M.M., Lu, Y., Singh, G.M., Cowan, M.J., Paciorek, C.J., Lin, J.K., Farzadfar, F., Khang, Y.H., Stevens, G.A., Rao, M., Ali, M.K., Riley, L.M., Robinson, C.A., Ezzati, M., 2011. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 378, 31–40. doi:10.1016/S0140-6736(11)60679-X
- Davoodi, H., Esmaeili, S., Mortazavian, A.M., 2013. Effects of milk and milk products consumption on cancer: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12, 249–264. doi:10.1111/1541-4337.12011
- de Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M., Sikkema, J., 2015. Encapsulation of nano beta-glucan for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food component. *Int. J. ChemTech Res.* 8, 587–598. doi:10.1016/j.idairyj.2009.11.008
- Dickinson, E., 1999. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein–polysaccharide interactions.pdf. *Food Sci. Technol.* 9.
- Djurić, M., Carić, M., Milanović, S., Tekić, M., Panić, M., 2004. Development of whey based beverages. *Eur. Food Res. Technol.* 219, 321–328.
- Dodds, P., 1989. Whey Beverage Technology. *J. Cult. Dairy Prod.* 54, 17–20.
- Durazzo, A., Turfani, V., Narducci, V., Azzini, E., Maiani, G., Carcea, M., 2014. Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carobs flours. *Food Chem.* 153, 109–113. doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.045
- Eigenmann, P.A., Sicherer, S.H., Borkowski, T.A., Cohen, B.D., Sampson, H.A., 1998. Prevalence of IgE-mediated food allergy among children with atopic dermatitis. *Pediatrics* 101, 1–8.
- Faber, M.T., Jensen, A., Søgaaard, M., Høgdall, E., Høgdall, C., Blaaekær, J., Kjær, S.K., 2012. Use of dairy products, lactose, and calcium and risk of ovarian cancer – Results from a Danish case-control study. *Acta Oncol. (Madr).* 51, 454–464. doi:10.3109/0284186X.2011.636754

- FAO, 2013. Codex General Standard For Cheese, Practice.
- FAOSTAT, 2016a. FAOSTAT: Rankings. Commod. by Ctry. Disponível em http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country (Acedido a 11.11.17).
- FAOSTAT, 2016b. FAOSTAT. Crop. by Prod. Quant. Disponível em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Acedido a 13.10.17).
- FENALAC, 2017. Revista Agros: Força da União nº 33.
- Ferreira-Dias, S., Valente, D.G., Abreu, J.M.F., 2007. Pattern recognition of acorns from different *Quercus* species based on oil content and fatty acid profile. *Grasas y Aceites* 54, 384–391. doi:10.3989/gya.2003.v54.i4.224
- Fonseca, P.A., Ferreira, R.B., Teixeira, A.R., 1997. Seed Proteins from *Quercus suber*. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3443–3447.
- Galsmar, I.;Bergmann, A., 1967. Spray Drying of Whey. *J. Soc. Dairy Technol.* 20, 5.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V.E., Casa, A., Gómez, E., 2000. Xanthan gum: production, recovery and properties. *Biotechnol. Adv.* 18, 549–579.
- Gasparin, F.S.R., Teles, J.M., Araújo, S.C., 2010. Alergia à proteína do leite de vaca versus intolerância à lactose: as diferenças e semelhanças. *Rev. Saúde Pesqui.* 3, 107–114.
- Gomes, R. G.; Penna, A.L., 2009. Características reológicas e sensoriais de bebidas lácteas funcionais. *Ciências Agrárias* 30, 629–646.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., 1999. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. *Bol. da Soc. Port. Biotecnol.* 64, 12–22.
- Holanda, A.O. do N., Oliveira, A.R.S. de, Cruz, K.J.C., Severo, J.S., Morais, J.B.S., Silva, B.B. da, Marreiro, D. do N., 2017. Zinc and metalloproteinases 2 and 9: What is their relation with breast cancer? *Rev. Assoc. Med. Bras.* 63, 78–84. doi:10.1590/1806-9282.63.01.78
- IDF, 2008. Dairy & Lactose Intolerance. Disponível em www.idfdairynutrition.com. Acedido a 02.01.2018.
- INE, 2013. Estatísticas Agrícolas. Lisboa, Portugal.
- Jauhainen, T., Korpela, R., 2007. Milk Peptides and Blood Pressure. *J. Nutr.* 137, 825S–829. doi:137/3/825S [pii]

- Jeli, I., Božani, R., Tratnik, L., 2008. Whey-based beverages- a new generation of dairy products. *Mljekarstvo* 58, 257–274.
- Kanis, J.A., McCloskey, E. V., Johansson, H., Cooper, C., Rizzoli, R., Reginster, J.Y., 2013. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos. Int.* 24, 23–57. doi:10.1007/s00198-012-2074-y
- Kar, T., Misra, A., 1999. Therapeutic properties of whey used as fermented drink. *Rev. Microbiol.* 163–169. doi:10.1590/S0001-37141999000200015
- Khelifa, M., Bahloul, A., Kitane, S., 2013. Determination of chemical composition of carob pod (*Ceratonia siliqua* L) and its morphological study. *J. Mater. Environ. Sci.* 4, 348–353.
- Kneepkens, F.C.M., Meijer, Y., 2009. Diagnosis and treatment of cow's milk allergy. *Clin. Pract.* 168, 891–896.
- Korhonen, H., 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J. Funct. Foods* 1, 177–187.
- Korus, J., Witczak, M., Ziobro, R., Juszcak, L., 2015. The influence of acorn flour on rheological properties of gluten-free dough and physical characteristics of the bread. *Eur. Food Res. Technol.* doi:10.1007/s00217-015-2417-y
- Kumar, N., Vandna, Hati, S., 2016. Fermented and Non Fermented Whey Beverages. *Beverage Food World* 42, 5.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi:10.1038/227680a0
- Lee, I.K., Vansaun, M.N., Shim, J.H., Matrisian, L.M., Gorden, D.L., 2013. Increased metastases are associated with inflammation and matrix metalloproteinase-9 activity at incision sites in a murine model of peritoneal dissemination of colorectal cancer. *J. Surg. Res.* doi:10.1016/j.jss.2012.04.074
- Lourenço, N.F.A., 2014. Concentração de soro de leite por Nanofiltração e secagem por Spray – Drying Engenharia Química. Instituto Superior Técnico.
- Lucey, J., Kelly, J., 1994. Cheese yield. *Int. J. Dairy Technol.* 47, 1–14. doi:10.1111/j.1471-0307.1994.tb01264.x
- Luporini, S., Bretas, R.E.S., 2011. Caracterização reológica da goma xantana: influência de

- íons metálicos univalente e trivalente e temperatura em experimentos dinâmicos. *Polímeros* 21, 188–194. doi:10.1590/S0104-14282011005000043
- Madureira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, F.X., 2007. Bovine whey proteins-Overview on their main biological properties. *Food Res. ternational*, 1197–1211.
- Madureira, A.R.R., Tavares, T., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, F.X., 2010. Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *J. Dairy Sci.* 93, 437–455. doi:10.3168/jds.2009-2566
- Malekinejad, H., Rezaabakhsh, A., 2015. Hormones in dairy foods and their impact on public health- A narrative review article. *Iran. J. Public Health* 44, 742–758.
- Menezes, C., Rocha, R., Coqueiro, F., Lopes, M., 2013. Lactose intolerance in inflammatory bowel disease patients, in: Organisation, E.C. and C. (Ed.), *Clinical: Diagnosis and Outcome* (2013). Vienna, Austria.
- Merritt, M.A., Cramer, D.W., Vitonis, A.F., Titus, L.J., Terry, K.L., 2013. Dairy foods and nutrients in relation to risk of ovarian cancer and major histological subtypes. *Int. J. Cancer* 132, 1114–1124. doi:10.1002/ijc.27701
- Mohanty, D.P., Mohapatra, S., 2016. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi J. Biol. Sci.* 23, 577–583. doi:10.1016/j.sjbs.2015.06.005
- Mordor Intelligence, 2017. *Whey Protein Market - Growth, Trends and Forecast (2017 - 2022)*. Glob. Whey Protein Mark. Disponível em <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-whey-protein-market-industry> (Acedido a 12.11.17).
- Nagase, H., Visse, R., Murphy, G., 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69, 562–573. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.002
- Nogueira, L.K., Aguiar-Oliveira, E., Kamimura, E.S., Maldonado, R.R., 2016. Milk and açai berry pulp improve sensorial acceptability of kefir-fermented milk beverage. *Acta Amaz.* 46, 417–424. doi:10.1590/1809-4392201600173
- Observatório da Diabetes, 2016. *Diabetes: Factos e Números - O Ano de 2015*. Lisboa.
- OECD/FAO, 2016. *Dairy and Dairy Products: Market situation*. doi:http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-11-en

- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.Y., 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1171–1185. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x
- Pelegrine, D.H., Gasparetto, C.A., 2003. Estudo da solubilidade das proteínas presentes no soro de leite e na clara de ovo. 57–6557.
- Pelegrine, D.H.G., Carrasqueira, R.L., 2008. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. VII Brazilian Meet. Chem. Food Beverages 145–151.
- Pelegrine, D.H.G., Gasparetto, C.A., 2005. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT - Food Sci. Technol.* 38, 77–80. doi:10.1016/j.lwt.2004.03.013
- Pereira, C., Henriques, M., Gomes, D., Gomez-Zavaglia, A., de Antoni, G., 2015. Novel functional whey-based drinks with great potential in the dairy industry. *Food Technol. Biotechnol.* 53, 307–314. doi:10.17113/ftb.53.03.15.4043
- Pescuma, M., Hébert, E.M., Mozzi, F., Font de Valdez, G., 2010. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 73–81. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011
- Pihlanto-Leppala, A., 1999. Isolation and characterisation of milk-derived bioactive peptides. Univ. Turku, Turku, Finl.
- Ralston, R.A., Truby, H., Palermo, C.E., Walker, K.Z., 2014. Colorectal Cancer and Nonfermented Milk, Solid Cheese, and Fermented Milk Consumption: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54, 1167–1179. doi:10.1080/10408398.2011.629353
- Rao, M.A., Okechukwu, P.E., Da Silva, P.M.S., Oliveira, J.C., 1997. Rheological behavior of heated starch dispersions in excess water: Role of starch granule. *Carbohydr. Polym.* 33, 273–283. doi:10.1016/S0144-8617(97)00025-8
- Raymundo, A., 1999. Estudo e optimização da capacidade emulsionante de isolados proteicos de *L. albus*. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.
- Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares
- Regulamento (UE) n.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de dezembro

de 2013 , que estabelece uma organização comum dos mercados dos produtos agrícolas e que revoga os Regulamentos (CEE) n. ° 922/72, (CEE) n. ° 234/79, (CE) n. ° 103797/2001, (CE) n. ° 1234/2007 do Conselho

Romano, M., DE Francesco, F., Zarantonello, L., Ruffolo, C., Ferraro, G.A., Zanus, G., Giordano, A., Bassi, N., Cillo, U., 2016. From Inflammation to Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Molecular Perspectives. *Anticancer Res.* 36, 1447–60.

Rozenberg, S., Body, J.J., Bruyère, O., Bergmann, P., Brandi, M.L., Cooper, C., Devogelaer, J.P., Gielen, E., Goemaere, S., Kaufman, J.M., Rizzoli, R., Reginster, J.Y., 2016. Effects of Dairy Products Consumption on Health: Benefits and Beliefs—A Commentary from the Belgian Bone Club and the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases. *Calcif. Tissue Int.* 98, 1–17. doi:10.1007/s00223-015-0062-x

Saha, D., Bhattacharya, S., 2010. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: A critical review. *J. Food Sci. Technol.* 47, 587–597. doi:10.1007/s13197-010-0162-6

Sanches, S.M., 2015. Identificação de péptidos produzidos pela fermentação láctica de subprodutos das indústrias de laticínios com capacidade inibidora das gelatinases da matriz, MMP-2 e MMP-9. Universidade do Porto: Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação.

Santos, M.I.S., 2016. Caracterização de agentes com potencial antimicrobiano para utilização na indústria alimentar. Tese de doutoramento. Universidade de Lisboa: Instituto Superior de Agronomia.

School of Rheology, 2016. Making Use Of Models : The Cross Model. *Cent. Ind. Rheol.* Disponível em <http://www.rheologyschool.com/advice/rheology-tips/25-making-use-of-models-the-cross-model> (Acedido a 08.03.17).

Setchell, K.D.R., 2001. Soy Isoflavones — Benefits and Risks from Nature’s Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *J. Am. Coll. Nutr.* 20, 37–41. doi:10.1080/07315724.2001.10719168

Sgarbieri, V.C., 2004. Propriedades fisiológicas funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev. Nutr.* 17, 397–409. doi:10.1590/S1415-52732004000400001

Shao, H., Han, G., Ling, P., Zhu, X., Liu, F., Jin, Y., Zhao, L., Zhang, T., 2012. Intra-articular injection of xanthan gum: A potential therapy for osteoarthritis. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 3,

449–453. doi:10.4236/abb.2012.324063

Sharma, S., Kumar, P., Betzel, C., Singh, T.P., 2001. Structure and function of proteins involved in milk allergies. *J. Chromatogr.* 756, 183–187.

Shraddha RC, C.R., Nalawade T, K.A., 2015. Whey Based Beverage: Its Functionality, Formulations, Health Benefits and Applications. *J. Food Process. Technol.* 6. doi:10.4172/2157-7110.1000495

Silva, S., Costa, E.M., Borges, A., Carvalho, A.P., Monteiro, M.J., Pintado, M.M.E., 2016. Nutritional characterization of acorn flour (a traditional component of the Mediterranean gastronomic folklore). *J. Food Meas. Charact.* 1–5. doi:10.1007/s11694-016-9340-1

Silveira, E.O., Silva, L.A., Raposo, A.E.S., 2016. Caracterização físico-química do soro de leite de cabra submetido a diferentes tratamentos térmicos 3–6.

Siso, M.I.G., 1996. The Biotechnological Utilization of Cheese Whey: a Review. *Bioresour. Technol.* 57, 1–11.

Sluková, M., Hinková, A., Henke, S., Smrž, F., Lukačiková, M., Pour, V., Bubník, Z., 2016. Cheese whey treated by membrane separation as a valuable ingredient for barley sourdough preparation. *J. Food Eng.* 172, 38–47. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.03.023

Smilowitz, J. T., Dillard, C. J., & German, J.B., 2005. Milk beyond essential nutrients: The metabolic food. *Aust. J. Dairy Technol.* 60(2 SPEC.), 77–83.

Smithers, G.W., 2008. Whey and whey proteins-From “gutter-to-gold.” *Int. Dairy J.* doi:10.1016/j.idairyj.2008.03.008

Song, M., Garrett, W.S., Chan, A.T., 2016. Nutrients, Foods, and Colorectal Cancer Prevention. *J. Gastroenterol.* 148, 1244–1260. doi:10.1053/j.gastro.2014.12.035.Nutrients

Sonomoto, K., Yokota, A., 2011. *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria*, 1ª Edição. ed. Norfolk, Reino Unido.

Sousa, I., 2001. *A Reologia dos Produtos Alimentares, Reologia e as suas Aplicações Industriais*. Gomes de Castro, A., Covas J. e Diogo, A., Instituto Piaget, Lisboa.

Swagerty, D.L., Walling, A.D., Klein, R.M., 2002. Lactose intolerance. *Am. Fam. Physician* 65, 1845–1850.

- Tat, D., Kenfield, S.A., Cowan, J.E., Broering, J.M., Carroll, P.R., Van Blarigan, E.L., Chan, J.M., 2017. Milk and other dairy foods in relation to prostate cancer recurrence: Data from the cancer of the prostate strategic urologic research endeavor (CaPSURE™). *Prostate* 1–8. doi:10.1002/pros.23441
- Tetra Pak International S.A., 2016. Soro do leite em pó. Disponível em <http://www.tetrapak.com/pt/findbyfood/whey-powder> (Acedido a 30.08.17).
- Toneli, J.T.C.L., Murr, F.E.X., Park, K.J., 2005. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. *Rev. Bras. Prod. Agroindustriais*, Camp. 7, 181–204.
- Toth, M., Chvyrkova, I., Bernardo, M.M., Hernandez-Barrantes, S., Fridman, R., 2003. Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: Role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 386–395. doi:10.1016/S0006-291X(03)01405-0
- Triantafillidis, J.K., Nasioulas, G., Kosmidis, P.A., 2009. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res.* 29, 2727–2737.
- Tsakali, E., Petrotos, K., Allesandro, A.D., 2010. A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. 6th Int. Conf. Simul. Model. Food Bio-Industry. FOODSIM 8.
- Vaclavik, V.A., Christian, E.W., 2008. Milk, Fermentation, and Fermented and Nonfermented Dairy Products, in: *Essentials of Food Science*. pp. 149–173. doi:10.1007/0-387-23413-6_7
- Virtanen, S.M., Hypponen, E., Laara, E., Vahasalo, P., Kulmala, P., Savola, K., Rasanen, L., 1998. Cow's Milk Consumption , Disease- Associated Autoantibodies and Type 1 Diabetes Mellitus : a Follow-up Study in Siblings of Diabetic Children. *J. Diabet. Med.* 15, 730–738.
- Whitbread, D., 2017. MyFoodData. Top 10 Foods High. Methionine. URL <https://www.myfooddata.com/articles/high-methionine-foods.php>
- Wijayanti, H.B., Bansal, N., Deeth, H.C., 2014. Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 1235–1251. doi:10.1111/1541-4337.12105

- Yadav, J.S.S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2015. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnol. Adv.* doi:10.1016/j.biotechadv.2015.07.002
- Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., Akoh, C.C., 2005. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7320–7329. doi:10.1021/jf051333o
- Zanin, C.M., Marchini, J.S., Carvalho, I.F., 2002. Reações adversas a alimentos e imunidade humoral : subclasses de IgG a antígenos alimentares. *Artig. Revisão* 24, 125–134.