

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO – QUÍMICA DE UM NOVO IOGURTE LÍQUIDO
COM NANOESTRUTURA DE β - LACTOGLOBULINA**

Márcio César Sá Albuquerque

Orientador: Prof. Dr. Igor José Boggione Santos

Ouro Branco

Dezembro/2017

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO – QUÍMICA DE UM NOVO IOGURTE LÍQUIDO
COM NANOESTRUTURA DE β - LACTOGLOBULINA**

Márcio César Sá Albuquerque

Trabalho de conclusão de curso
apresentado em cumprimento às
exigências do Curso de Bacharelado em
Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João Del Rei.

Orientador: Prof. Dr. Igor José Boggione Santos

Ouro Branco

Dezembro/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI

CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO – QUÍMICA DE UM NOVO IOGURTE LÍQUIDO
COM NANOESTRUTURA DE β - LACTOGLOBULINA**

Márcio César Sá Albuquerque

A banca examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Prof. Dr. Igor José Boggione Santos - Orientador

Profa. Dra. Elisa de León Piló - Examinadora

Cinthia Rocha da Silva - Examinadora

Ouro Branco, ____/____/____

Resumo

A nanotecnologia vem sendo aplicada em diversas áreas da ciência, em uma proporção cada vez maior ao longo dos anos. Dentre essas áreas, o setor alimentício tem se mostrado com grande potencial para aplicabilidade dessa tecnologia, pois compostos em escala nanométrica proporcionam características únicas aos alimentos, como melhor biodisponibilidade e absorção de substâncias funcionais. Dessa forma, o trabalho teve como objetivo a caracterização físico-química de um novo iogurte líquido com a adição da proteína do soro do leite β -lactoglobulina nanoestruturada e sua análise de viscosidade, ácidos tituláveis, pH e sólidos totais. Os resultados de viscosidade mostraram que tanto o iogurte com a proteína nanoestrutura e com a proteína em sua forma nativa não apresentaram diferença significativa pelo método de Tukey. O mesmo foi observado para a concentração de ácido láctico, sólidos totais e pH, mantendo todos esses parâmetros dentro dos padrões exigidos pela legislação em vigor. Tais resultados mostram o grande potencial de aplicação de proteínas nanoestruturadas na indústria de alimentos, pois a não variação dos parâmetros analisados garantem a não influência na textura e sabor característico do iogurte, agrega mais valor ao produto e mostra também o potencial que nanoestruturas de proteínas lácticas podem ter na aplicação de outros métodos nanotecnológicos como o nanoencapsulamento de compostos bioativos.

Palavras Chave: *iogurte líquido, β -lactoglobulina, proteína nanoestruturada, nanotecnologia.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da α -lactoalbumina parcialmente hidrolisada em nanotubos na presença de Ca^{2+}	9
Figura 2: Proteína bovina β -lactoglobulina em estrutura 3D.....	9
Figura 3: Fluxograma para a produção do iogurte líquido com a β -lg nativa e nanoestruturada.....	12
Figura 4: Gráfico da viscosidade (Cp) <i>versus</i> rotações por minuto (rpm) para as amostras de iogurte líquido na temperatura ambiente (25 °C).....	14
Figura 5: Gráfico da viscosidade (Cp) <i>versus</i> rotações por minuto (rpm) para as amostras de iogurte líquido na temperatura de armazenamento (4 °C).....	15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração de ácidos tituláveis e pH das amostras de iogurte líquido com a proteína β -lg nativa e com a β -lg nanoestruturada.....	16
Tabela 2: Sólidos dissolvidos presentes nas amostras de iogurte líquido com a proteína β -lg nativa e nanoestruturada.....	17

ABREVIATURAS E SIGLAS

α -la	alfa lactoalbumina
β -lg	beta lactoglobulina
nm	nanômetro
rpm	rotação por minuto
cP	centipoise
GRAS	Geralmente reconhecido como Seguro
KDa	kilodaltons
BCAA	aminoácidos de cadeia ramificada
MPC	concentrado proteico do leite
SMP	concentrado de leite desnatado em pó
WPC	concentrado proteico do soro

Sumário

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVO	11
2.1	Objetivos específicos	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1	logurte Líquido	11
3.2	Nanotecnologia	14
3.3	Proteínas Nanoestruturadas	16
3.4	β – Lactoglobulina	17
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1	Material	19
4.2	Métodos	19
4.2.1	Obtenção da nanoestrutura de β – Lactoglobulina	19
4.2.2	Preparação do logurte	19
4.2.3	Avaliação da Viscosidade.....	20
4.2.4	Titulação	20
4.2.5	Sólidos Totais e pH.....	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
5.1	Viscosidade	21
5.2	Acidez titulável e pH.....	23
5.3	Sólidos Totais.....	24
6	CONCLUSÃO	25
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

1. INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia sempre desempenhou um papel de enorme relevância na economia brasileira, representando uma das mais importantes estruturas produtivas presentes no país. Dentre os diversos setores da indústria alimentícia, o setor de laticínios destaca-se como um dos principais. Pesquisas tem revelado que a participação dos laticínios no faturamento total do setor da indústria de alimentos seja de aproximadamente 10% (Carvalho 2010).

As indústrias de laticínios são unidades fabris que processam o leite, produzindo os mais diversos derivados, entre estes o queijo e leites fermentados. Dessas indústrias, são gerados resíduos, como o soro do leite, que apesar de ser reaproveitado na fabricação de outros produtos, quase 50% ainda é descartado. No Brasil, existem laticínios onde essa porcentagem de descarte chega a 80%. A identificação de alternativas para um adequado aproveitamento desse subproduto é de fundamental importância em função de sua qualidade nutricional, do volume descartado e de seu poder poluente (Giroto and Pawlowsky 2001).

As proteínas do soro do leite podem ser consideradas de alta qualidade nutricional e com excelentes propriedades funcionais. A aplicação dos produtos proteicos do soro como ingredientes funcionais são cada vez mais importantes na indústria. Do total de proteínas do leite, 20% correspondem a proteínas do soro, sendo que α – lactalbumina (α -la) e a β – lactoglobulina (β -lg) representam de 70 a 80 % dessa porcentagem do soro (Antunes 2003).

No soro são encontradas, além dessas proteínas, a albumina de soro bovino, imunoglobulinas, protease-peptonas, lactoferrina, lactoperoxidase e outras enzimas. A β -lg é a proteína presente em maior quantidade. Corresponde a cerca de 50% do total das proteínas. A estrutura globular da β -lg é resistente a ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago. Essa estabilidade confere uma função biológica a esta proteína no transporte do retinol (pro-vitamina A) do estômago para o intestino (Zuñiga 2003).

Nos últimos quarentas anos, tem sido grande os esforços de pesquisadores para encontrar novas aplicações para o soro do leite. O uso da nanotecnologia tem se tornado uma importante ferramenta para essas novas aplicações. A nanoestruturação de compostos bioativos, assim como o nanoencapsulamento de vitaminas, minerais e micronutrientes, podem ser citadas como exemplo. Tais compostos nanotecnológicos

auxiliam o organismo, tornando possível uma maior biodisponibilidade dessas substâncias ativas (da Silva, Premebida *et al.* 2012).

A nanotecnologia, responsável pela utilização de materiais em tamanho nanométrico, contribui para a obtenção de produtos com propriedades técnico-funcionais únicas (de Carvalho Martins, de Oliveira Braga *et al.* 2016). Apesar de não constar na literatura muitos trabalhos referentes a nanoestruturação de compostos proteicos, estudos nessa área tem mostrado seu grande potencial de aplicação na indústria de alimentos, setor que possui uma demanda por consumidores sempre em expansão.

Por esse motivo, o presente trabalho propõe a caracterização físico-química de um novo iogurte líquido com e sem a proteína β – lactoglobulina nanoestruturada, visando estudar o comportamento da viscosidade, acidez titulável, pH e sólidos totais.

2. OBJETIVO

Caracterizar algumas propriedades físico-químicas de um novo iogurte líquido contendo a proteína do soro do leite β – lactoglobulina nanoestruturada.

2.1. Objetivos específicos

- Obter a nanoestrutura de β – lactoglobulina.
- Avaliar a viscosidade, acidez titulável, sólidos totais e pH do iogurte.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Iogurte Líquido

O método fermentativo de acidificação do leite é um dos métodos mais antigos que se tem conhecimento de preservação do leite. Os produtos dessa fermentação variam conforme o tipo de leite, com a composição da microbiota fermentativa, assim como a técnica e o tipo de equipamentos utilizados para sua produção (Tamime and Deeth 1980). Dentre os produtos obtidos desse método, o iogurte é um dos principais, desempenhando muita relevância com o passar do tempo. O iogurte se encontra dentro de uma restrita lista dos poucos alimentos conhecidos e consumidos a mais de 4.300 anos (Moraes 2004).

O termo iogurte é derivado da palavra “jugurt” e recebe variadas designações em diversos lugares do mundo. Na Índia por exemplo, é muito conhecido como “dahi”, já na Grécia é conhecido como “tiaourti” e na Turquia como “eyran”, sendo considerado nessas regiões um alimento saudável e muito popular. Apesar dos primeiros iogurtes comerciais terem sido produzidos na Europa em 1920, o aumento do mercado consumidor para esse produto foi expressivo à partir da década de 60, muito devido a melhoria das técnicas de produção e comercialização (Tamime and Deeth 1980).

Existem no mercado atual variados tipos de iogurte classificados de acordo com a técnica produtiva de elaboração, composição, consistência, textura e sabor. Os tipos de iogurte são (Tamime and Deeth 1980, Silva 2007):

- **iogurte tradicional** (*set yogurt*): processo na qual a fermentação se processa dentro da própria embalagem, não sofre homogeneização e o resultado é um produto firme, mais ou menos consistente;
- **iogurte batido** (*stirred yogurt*): processo de fermentação acontece em fermentadeiras ou incubadoras com posterior quebra do coágulo formado;
- **iogurte líquido** (*fluid yogurt*): o processo de fermentação é realizado em tanques; é comercializado em embalagens plásticas tipo garrafa ou do tipo cartonadas.

Independentemente do tipo de iogurte a ser fabricado, as reações bioquímicas realizadas pelos microrganismos fermentativos responsáveis pela formação do gel/coágulo são exatamente as mesmas. As únicas diferenças existentes entre o iogurte firme e o batido são as propriedades reológicas do coágulo (Tamime and Deeth 1980).

De acordo com (Robert 2008), o iogurte líquido difere do iogurte batido principalmente do ponto de vista sensorial, pela menor viscosidade e menor textura, sendo ainda o leite fermentado mais importante economicamente, obtido da coagulação do leite pela ação de dois microrganismos, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, e que fornece uma melhor assimilação, pelo organismo, de certos componentes, principalmente a lactose e proteínas.

Ainda segundo (Robert 2008), o iogurte possui um baixo teor de lactose, pois é parcialmente transformada em ácido láctico, durante o percurso da fermentação, e isso facilita a assimilação do iogurte em indivíduos com intolerância a esse dissacarídeo. O iogurte é versátil, prático e possui um sabor muito agradável. Todas essas características fazem com que esse produto seja muito valorizado e bastante consumido.

O sabor suave do iogurte é obtido através da reação simbiótica das culturas lácteas. Além do ácido láctico, essas culturas produzem o acetaldeído, diacetil, ácido acético e outros compostos voláteis. A cultura responsável pela formação do iogurte deve conter uma porcentagem igual dos dois microrganismos, do contrário não se obterá a consistência e a característica desejável (Biscaia, Stadler *et al.* 2004). O *Streptococcus thermophilus* promove o crescimento dos *Lactobacillus* removendo o oxigênio e promovendo a liberação de substâncias estimulantes como ácido fórmico, pirúvico e CO₂. Por outro lado, os *Lactobacillus* também estimulam os *Streptococcus*

pela liberação de certos aminoácidos principalmente glicina e histidina, necessárias ao seu crescimento e que são provenientes da degradação das proteínas do leite (Tamine *et. al* 1991).

O iogurte possui uma fonte rica de substâncias essenciais ao organismo, como as proteínas, o cálcio, fósforo, algumas vitaminas e carboidratos. O consumo deste produto está relacionado à imagem positiva de alimento saudável e nutritivo, associado às suas propriedades e está dentro das mais variadas dietas (Silva 2007).

Os processos bioquímicos realizados pelas culturas lácteas que leva a alta acidez do iogurte é associado ao desenvolvimento do aroma e sabor, no entanto o pH usual para iogurte é 4,2 - 4,4, pois uma produção exagerada de ácido conduz a hiper acidificação durante a incubação, como também nas posteriores etapas de resfriamento e armazenamento do produto, o que não é desejável, deixando assim o produto inviável para comercialização. As culturas clássicas podem ser adicionadas de *L.acidophillus* e *bifidobactérias* ou ambas, as quais contribuem com uma acidez não agressiva e com um sabor característico, além de apresentarem benefícios probióticos interessantes (Tamine *et. al* 1991).

As características físicas referentes a viscosidade e consistência de um determinado produto podem determinar a aceitação ou não por parte dos consumidores, sendo então importantes durante o processamento até mesmo na determinação de seus parâmetros. A redução da viscosidade do iogurte pode acontecer em diferentes etapas, tanto referente ao tipo de substâncias e aditivos acrescentados no início de sua produção, como após a incubação: durante bombeamento e transporte, no resfriamento e nas operações de acondicionamento (Penna, Oliveira *et al.* 1997)

O iogurte é um derivado do leite que apresenta uma das melhores margens de rentabilidade para quem produz produtos lácteos, devido ao fato de não passar por nenhum processo de concentração, ou seja, seu volume é o mesmo desde o início até o final do processo de produção, podendo até ser aumentado com a inserção de frutas, cereais e algumas sementes (Santos 1998).

O mercado de iogurte no Brasil, em sua totalidade, movimentou cerca 2 bilhões de reais apenas em 2005. Apesar da grande variedade de sabores e marcas disponíveis no país, o consumo *per capita* de iogurte no Brasil é de apenas 3 kg por ano, valor ainda inferior quando comparado a outros países sul americanos, como os

vizinhos, Uruguai e Argentina, onde o consumo *per capita* do produto é de 7 a 19 kg ao ano. As regiões que mais consomem iogurte no Brasil são: São Paulo, Rio de Janeiro, Nordeste e Centro-Oeste (Ribeiro, Minim *et al.* 2015).

3.2. Nanotecnologia

O termo nanotecnologia foi inicialmente introduzido pelo engenheiro japonês Norio Taniguchi, para designar uma tecnologia nova que ia além do controle de materiais e da engenharia em microescala (Uskoković 2007). A nanotecnologia se caracteriza pela capacidade de trabalhar em níveis moleculares e supramoleculares (numa escala de 1-100 nm) para se entender, caracterizar, criar e manipular estruturas como também sistemas que apresentem propriedades novas derivadas de suas nanoestruturas. A nanotecnologia tem, portanto, como foco o projeto, caracterização, produção e aplicação de sistemas e componentes em tamanho nanométrico (Roco 2003).

É possível identificar a presença da nanotecnologia em períodos remotos da história da humanidade se levarmos em consideração os processos químicos, físicos e biológicos que ocorrem na natureza. Há relatos por volta de aproximadamente 4000 a.C., que mostravam que os alquimistas egípcios utilizavam o “elixir de ouro” para estimular a mente e restaurar a juventude. O famoso “elixir da longa vida” citado por esses alquimistas era constituído na verdade por partículas de ouro em suspensão com tamanho da ordem de 1-100 nm (Ferreira and Varela 2009).

Ainda segundo Ferreira e Varela (2009), apesar da nanotecnologia estar presente na natureza há milhares de anos, foi apenas na década de 1950 que a nanociência ganhou destaque no meio científico. O físico americano Richard Feynman, em conferência na Reunião da Sociedade Americana de Física, sugeriu a construção e a manipulação, átomo a átomo, de objetos em tamanho nanométrico.

A indústria alimentícia é um dos setores que atraem mais investimentos dentre as diversas áreas em que a nanotecnologia pode ser utilizada. Nesse mercado, se incluem o desenvolvimento de novos materiais funcionais, produtos e embalagens, alimentos com propriedades potencializadas importantes para organismo, além de métodos para melhoria da segurança alimentar e de biossegurança. No uso em

embalagens, favorece uma maior segurança no armazenamento de alimentos, dentre vários outros benefícios (Perez, Bertagnolli *et al.* 2016).

Na área de alimentos, existem desafios que as ferramentas nanotecnológicas podem auxiliar, que são: garantir alimentos de modo sustentável com maior qualidade e segurança, oferecer nutrientes específicos para certos tipos de consumidores e auxiliar na prevenção de doenças. Grande é o destaque da influência das propriedades de materiais dos alimentos em dimensões nanométricas na sua biodisponibilidade e no seu valor nutricional (Bromberg 2010).

O termo nanoalimento define os alimentos que foram cultivados, produzidos, processados ou embalados utilizando-se técnicas ou instrumentos nanotecnológicos, ou para os quais nanomateriais manufaturados tenham sido adicionados. Alimentos funcionais podem conter nanomateriais como aditivos ou suplementos, com sistema de liberação programado, destinado a aumentar a eficácia de compostos bioativos, como peptídeos, carboidratos ou lipídeos (Barros 2011).

O potencial é grande da nanotecnologia voltada a alteração e manipulação de produtos alimentícios e para que ocorra uma entrega mais eficaz de uma variedade de compostos de interesse biológico, como proteínas, nutrientes e antioxidantes, que contribuem positivamente para a saúde das pessoas (Bromberg 2010).

A legislação aplicada a indústria alimentar é muito rígida e exige que todos os materiais utilizados por essa indústria sejam confiáveis e que garantam segurança para os consumidores. Isso torna um grande desafio para a utilização de nanotecnologia na área alimentar que siga o estatuto do GRAS (Generally Recognized as Safe – traduzido para o português como “Geralmente conhecido como seguro”). Alguns materiais podem ser usados seguindo essas normas, como polissacarídeos, proteínas e lipídeos que devido a sua biodegradabilidade e não toxicidade, podem ser utilizados para construir sistemas nanométricos (Pinheiro, Cerqueira *et al.* 2013).

Se por um lado as nanotecnologias proporcionam melhorias em setores industriais, como alimentos, embalagens e na qualidade nutricional, podem também trazer riscos à saúde humana como também ao meio ambiente. Porém, a maior preocupação ainda se deve pela falta de conhecimento que há entre as interações dessas nanoestruturas a nível molecular e fisiológico sobre a saúde das pessoas e do meio em que elas se encontram (Perez, Bertagnolli *et al.* 2016). As pesquisas sobre

os riscos reais das nanoestruturas nos seres humanos como um todo ainda é incipiente (da Silva, Premebida *et al.* 2012)

O mercado mundial de produtos que aplicam as técnicas da nanotecnologia movimentou, em 2009, 250 bilhões de dólares. Apenas no Brasil, existem mais de 2000 pesquisadores trabalhando em projetos nessa área na academia e mais de 80 empresas que desenvolvem algum tipo de produto nanotecnológico. A indústria vê na nanotecnologia o futuro do desenvolvimento de muitos de seus produtos e vê como perspectiva um crescimento exponencial dessa área nos próximos anos (Fusco 2009).

3.3. Proteínas Nanoestruturadas

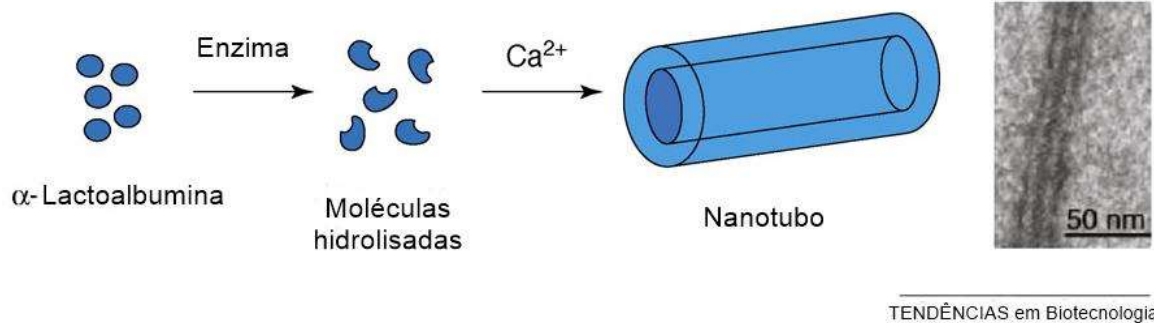
Os compostos alimentares nanoestruturados estão sendo desenvolvidos com o apelo de oferecerem melhor sabor, textura e consistência. Nanopartículas poliméricas, mais especificamente biopolímeros de grau alimentício, como polissacarídeo e inclusive proteínas, podem ser usados e manipulados para produção de partículas nanométricas (Perez, Bertagnolli *et al.* 2016).

Os principais materiais usados para formação de filmes de grau alimentício, como os nanolaminados, que são filmes alimentício extremamente finos (1-100 nm), são além de polissacarídeos e lipídeos, proteínas nanoestruturadas (Perez, Bertagnolli *et al.* 2016).

Nanotubos também possuem grande potencial na área alimentícia, pois aumentam propriedades mecânicas em termos de resistência à tração e à elasticidade uma vez incorporados em polímeros estruturais (Sozer and Kokini 2009).

Ainda, os autores Sozer e Kokine (2009) revelam a importância da possibilidade para o setor de alimentos da obtenção de nanotubos, exemplificado na Figura 1, de proteínas do leite como a lactoalbumina por hidrólise parcial. A informação obtida desse estudo pode ser utilizada para a realização de novas aplicações dos nanotubos nesse setor.

Figura 1: Representação da α -lactoalbumina parcialmente hidrolisada em nanotubos na presença de Ca^{2+} .

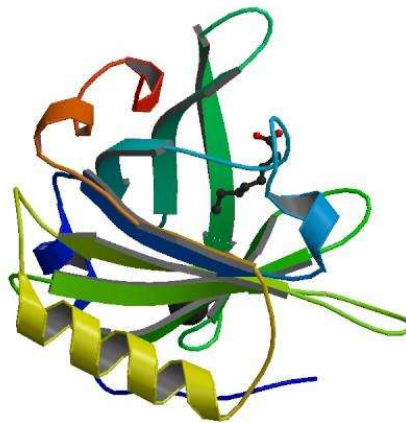


Fonte: Adaptado de Sozer e Kokine (2009).

3.4. β – Lactoglobulina

A β -lactoglobulina (β -lg), Figura 2, representa cerca de 50% da proteína do soro e 12% da proteína total no leite bovino. Consiste de uma sequência de 162 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 18,4 kDa (Botaro, Lima *et al.* 2007).

Figura 2: Proteína bovina β -lactoglobulina em estrutura 3D.



Fonte: Protein Data Bank (2010).

A β -lactoglobulina tem sido a proteína mais estudada na história da ciência proteica. Isso se deve muito a sua abundância no leite bovino, contendo cerca de

0,2 g/100 mL junto à caseína (2,9 g/100 mL), tornando-se facilmente acessível a pesquisadores (Sakurai, Konuma *et al.* 2009).

É o peptídeo que apresenta maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), com cerca de 25,1%. Importante carreadora de retinol (pró vitamina A) materno para o filhote em animais; em humanos essa função biológica é desprezada, uma vez que a β -lg não está presente no leite humano (Haraguchi, Abreu *et al.* 2006).

Foi a primeira proteína do leite a ser cristalizada. A β -lg é uma proteína relativamente rica em aminoácidos sulfurados. Os resíduos de cisteína são capazes de reagir com os grupamentos sulfídricos da κ -caseína em certas condições de tratamento térmico. É também responsável pelo sabor de cozido em leites aquecidos (Zuñiga 2003).

Esta proteína é termolábil. Apresenta mudanças conformacionais reversíveis em temperaturas menores que 70°C, porém em temperaturas elevadas, podem provocar sua desnaturação e polimerização irreversível. É também considerada um excelente agente de gelatinização (Morr and Ha 1993).

Fox e McSweeney (1998) descreve a estrutura da β -lg como sendo globular e resistente a ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago. Essa estabilidade confere uma função biológica a esta proteína no transporte de retinol do estômago para o intestino.

Há outras funções fisiológicas que podem estar associadas com a β -lg que são: capacidade de se ligar a ácidos graxos livres e o estímulo para a síntese da glutathione, um tripeptídeo anticarcinogênico produzido no fígado capaz de evitar a formação de tumores intestinais (Fox and Mcsweeney 1998).

A β -lg sendo uma proteína de grande valor nutricional e elevada solubilidade e estabilidade pode ser usada para a fortificação de bebidas e sucos de frutas. Preparados enzimáticos hidrolisados com β -lg são usados como suplemento para convalescentes, já que muitos peptídios da β -lg podem ser absorvidos diretamente pelo intestino. Também, a partir de hidrolisados de β -lg, são preparados leites com baixo conteúdo de fenilalanina, utilizados na alimentação de lactentes com fenilcetonúria, uma enfermidade de origem genética que provoca a não-metabolização de fenilalanina e pode causar, entre outros problemas, deficiência mental (Grasselli, Navarro *et al.* 1997, Zuñiga 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

A proteína β - lactoglobulina (β -lg; contendo 93,6% β -lg) utilizada foi gentilmente cedida pela Davigo Foods Internacional (EUA). O leite utilizado foi o integral pasteurizado da marca Santa Edwiges (Brasil). O HCl e o NaOH foram adquiridos da Êxodo Científico (Brasil) e as culturas lácteas da Rica Nata (Brasil).

A aferição do pH do iogurte foi feita pelo equipamento da marca Del Lab (Brasil). Foram utilizados também reagentes químicos de graus analíticos e água destilada purificada através de osmose reversa Hidrotek (Portugal).

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção da nanoestrutura de β – Lactoglobulina

Preparou-se uma solução de proteína β -lactoglobulina nativa a 1% (m/v). Adicionou-se HCl até atingir o pH 3 agitando por 1 hora a 85 °C. As nanoestruturas foram diluídas em tampão citrato (pH 3) e água na proporção 1:10. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em geladeira a 4°C.

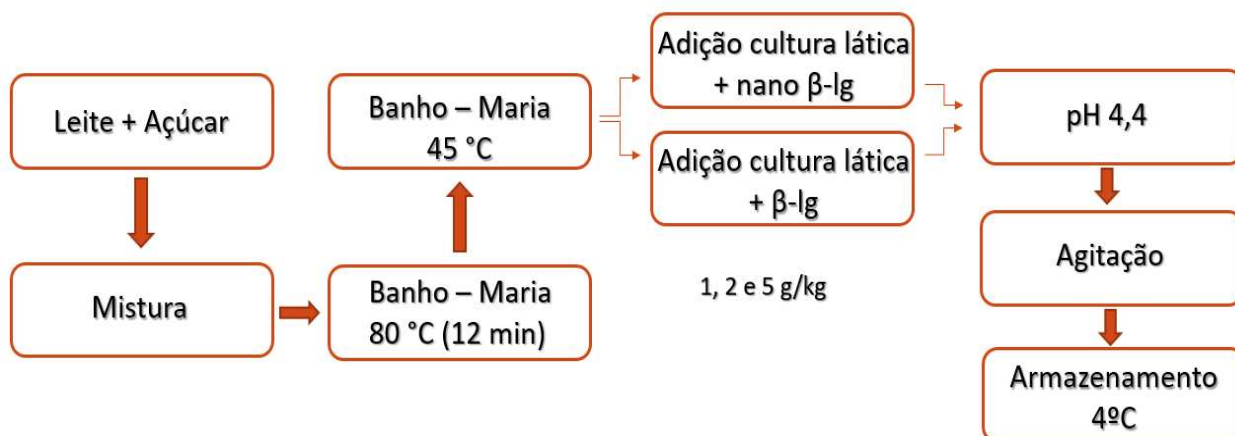
4.2.2. Preparação do iogurte

O iogurte líquido com a proteína nativa e nanoestruturada foi produzida em duplicata, utilizando 100 g de açúcar por litro de leite mais a cultura láctica (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*). Foi feito o iogurte com a adição da β -lactoglobulina nanoestruturada e nativa em três concentrações diferentes, 1, 2 e 5 g de nanoestrutura de proteína por quilo de produto.

Os ingredientes foram misturados, exceto a cultura láctica e a proteínas nativas e nanoestruturadas da β -lg. Após a pasteurização do leite em banho-maria por 12 min a 80°C, adicionou-se a cultura láctea e a proteína nativa em tubos falcon. Cada amostra recebeu a quantidade de 1, 2 e 5 g/ kg de proteína nativa. O mesmo se processou para a proteína nanoestruturada, totalizando 14 tubos falcon juntamente com o controle. Após essa etapa, os tubos foram transferidos para um banho a 45 °C. Após o iogurte atingir o pH 4,4, a amostra foi agitada vigorosamente e o produto foi

armazenado em geladeira a 4°C. A Figura 3 mostra o fluxograma do processo de produção do iogurte líquido convencional com proteínas β -lg nanoestruturas e nativas.

Figura 3: Fluxograma para a produção do iogurte líquido com a β -lg nativa e nanoestruturada.



4.2.3. Avaliação da Viscosidade

A viscosidade foi avaliada através do viscosímetro de Brookfield (EUA). Aferiu-se a viscosidade em 100; 50; 20; 10; 5; 4; 2,5; 2; 1 e 0,5 rotações por minuto (rpm) na temperatura de armazenamento (4°C) e na temperatura ambiente (25°C) do produto. Como resultado para cada amostra obteve-se a viscosidade aparente (cP) (Carvalho, Fonseca *et al.*).

4.2.4. Titulação

Retirou 10 mL de iogurte com o auxílio de uma proveta e o transferiu para um erlenmayer de 125 mL juntamente com 10 mL de água destilada e 3 gotas de fenoftaleína. Titulou-se com NaOH 0,1 mol.L⁻¹ cada amostra com e sem a nanoestrutura nas diferentes concentrações pré-estabelecidas para posterior análise de acidez titulável.

4.2.5. Sólidos Totais e pH

O pH foi medido via pHmetro e os sólidos totais foi medido por um refratômetro.

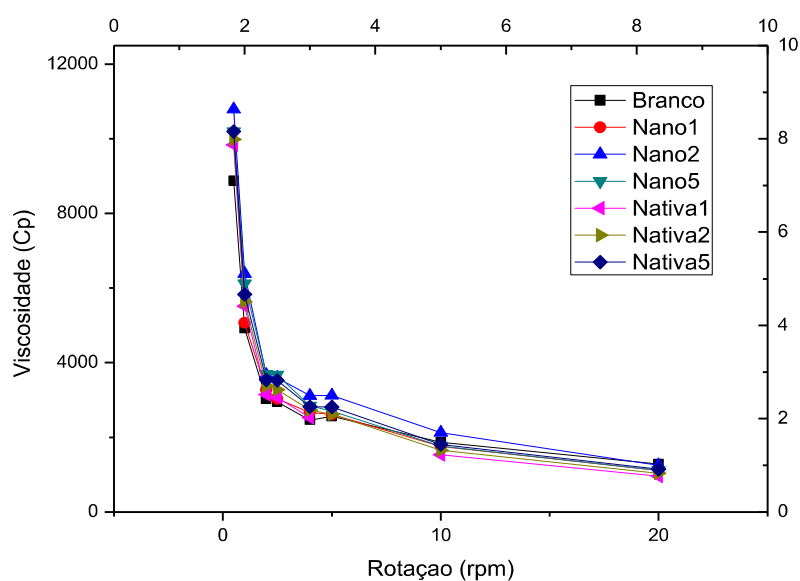
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Viscosidade

Na avaliação da consistência, deve-se levar em conta o corpo do produto quando consumido. Coágulo com grumos, corpo fraco e problemas com a viscosidade são defeitos que podem levar à rejeição por parte dos consumidores (Guedes Neto, Fonseca *et al.* 2003).

Portanto, a viscosidade é uma característica físico-química de importância fundamental para a apresentação do iogurte. Ela pode ser definida como a resistência que o líquido oferece para certa força aplicada, sendo dependente de vários aspectos do processo de fabricação, como tratamento térmico do leite, condições de incubação, resfriamento e cultura láctica utilizada (Almeida, Bonassi *et al.* 2001). A Figura 4 mostra a viscosidade do iogurte a 25°C em diferentes rotações obtidas pelo viscosímetro.

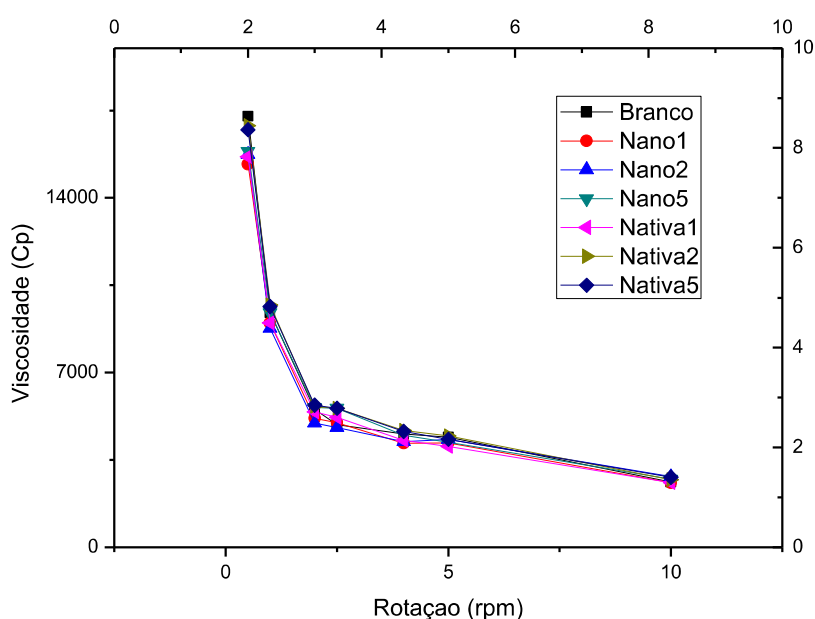
Figura 4: Gráfico da viscosidade (Cp) *versus* rotações por minuto (rpm) para as amostras de iogurte líquido na temperatura ambiente (25 °C).



Fonte: Márcio Albuquerque.

É possível caracterizar o efeito que a velocidade de rotação causa no valor dado da viscosidade. Segundo (Martin-Diana, Janer *et al.* 2003), o teor de proteínas podem influenciar a viscosidade do produto. Porém, percebe-se que a viscosidade para cada rotação não teve uma variação significativa, segundo análise estatística de Tukey (nível de 5% de confiança), mesmo com a adição de proteínas β -lg nativas e nanoestruturadas. Essa não variação da viscosidade é importante, pois dessa forma a proteína nanoestruturada pode ser utilizada em conjunto a outras técnicas como o encapsulamento de compostos bioativos, aumentando dessa forma o valor nutricional e agregando valor ao iogurte, sem alterar-lhe as características reológicas. A Figura 5 mostra a viscosidade do iogurte à 4°C.

Figura 5: Gráfico da viscosidade (Cp) *versus* rotações por minuto (rpm) para as amostras de iogurte líquido na temperatura de armazenamento (4 °C).



Fonte: Márcio Albuquerque.

O comportamento reológico à 4 °C do iogurte foi o mesmo que à 25 °C. Segundo Martínéz *et al.* (2002), a adição de alguns aditivos proteicos lácticos, como os concentrados proteicos do leite (MPC) e leite em pó desnatado (SMP), confere maior viscosidade a iogurtes, devido a presença de lactose nesses aditivos. Essa viscosidade é menor se comparada com a adição de concentrados proteicos do soro (WPC), pois os níveis de lactose são menores. Tal característica das WPC aliada à

sua baixa concentração nas amostras de iogurte, pode ser uma justificativa da semelhança reológica mesmo nas diferentes temperaturas.

A viscosidade do iogurte diminui com o aumento da taxa de deformação, indicando comportamento de fluido não newtoniano. Essa viscosidade aparente decresce devido ao rearranjo e/ou deformação das partículas, que resulta na diminuição da resistência ao escoamento (Rao 1986, Borwankar 1992).

5.2. Acidez titulável e pH

O sabor e aroma dos produtos fermentados devem ser ligeiramente ácidos, portanto dependem dos microrganismos da cultura e de seu metabolismo durante a fermentação (Guedes Neto, Fonseca *et al.* 2003).

A acidez, o sabor, o aroma e a cultura “starter” são aspectos considerados relevantes, do ponto de vista de qualidade do produto. Conforme a intensidade da acidez, o produto pode ser classificado em suave ou insípido, e ácido ou muito ácido (Martin 2002).

Tabela 1: Concentração de ácidos tituláveis e pH das amostras de iogurte líquido com a proteína β -lg nativa e com a β -lg nanoestruturada.

Amostra de iogurte líquido	Concentração de ácidos tituláveis (% de Ácido láctico)	pH
Branco	0,94 ^a	4,77 ^b
β -lg nanoestruturada 1g/kg	0,96 ^a	4,88 ^b
β -lg nanoestruturada 2g/kg	0,95 ^a	4,76 ^b
β -lg nanoestruturada 5g/kg	0,97 ^a	4,78 ^b
β -lg nativa 1g/kg	0,94 ^a	4,68 ^b
β -lg nativa 2g/kg	0,95 ^a	4,78 ^b
β -lg nativa 5g/kg	0,95 ^a	4,67 ^b

a,b = estatisticamente iguais.

A acidez do iogurte é muito variável, e a mesma influencia consideravelmente seu consumo (Souza 1990). A adição das proteínas nativas e nanoestruturadas no iogurte líquido não exerceu variância significativa, segundo método estatístico de Tukey, na porcentagem de ácido láctico. Alguns autores como (Abreu 1997), relatam uma acidez desejável em torno de 0,70 a 0,72%, já para (Brandão 1995), o iogurte

deve apresentar uma quantidade de ácido láctico de 0,9 a 1,0%. Ainda que exista algumas controvérsias a respeito dessa porcentagem, o iogurte com as proteínas β -lg nativa e nanoestruturada se manteve de acordo com o estabelecido pela legislação brasileira em vigor, que é de 0,6 a 1,5 % de ácido láctico (da Silva, Machado *et al.* 2016).

O pH também é uma característica físico-química muito importante, uma vez que o iogurte com baixa acidez ($\text{pH} > 4,6$) favorece a separação do soro, porque o gel não foi suficientemente formado, por outro lado, em $\text{pH} < 4,0$ ocorre a contração do coágulo devido à redução da hidratação das proteínas, ocasionando dessoramento do produto, e tais características influenciam de maneira negativa dependendo do consumidor (Brandão 1995).

De acordo com da Silva (2016), valores de pH implicam também nas atividades metabólicas das culturas lácticas, o que pode favorecer um certo tipo de bactéria em detrimento a outra. Ainda pelo método de Tukey, foi possível observar que também não houve variação significativa nos valores de pH para as amostras com proteína nanoestruturada e nativa, e que tais resultados se mantiveram dentro dos limites aceitáveis, em $\text{pH} > 4,0$ e $< 4,6$.

A variação não significativa dos valores de concentração de ácido láctico pode ter como justificativa o fato de que a β -lactoglobulina, segundo (Antunes, Cazetto *et al.* 2005), não influencia na sobrevivência e no crescimento de microrganismos produtores de ácido láctico. Tal característica pode ter sido mantida mesmo com a proteína em sua forma nanoestruturada.

5.3. Sólidos Totais

A escala Brix é aferida pelo número de gramas de açúcar contidos em 100g de solução. Quando se mede o índice de refração de uma solução de açúcar, a leitura em percentagem de Brix deve combinar com a concentração real de açúcar na solução. As escalas em percentagem de Brix em amostras de iogurte líquido, por exemplo, apresentam as concentrações percentuais dos sólidos solúveis totais dissolvidos, começando com açúcar, sais, proteínas, ácidos, etc. A leitura do valor medido é a soma total desses sólidos (Moraes 2006)

Tabela 2: Sólidos dissolvidos presentes nas amostras de iogurte líquido com a proteína β -lg nativa e nanoestruturada.

Amostra de iogurte líquido	Brix (Sólidos Dissolvidos)
Branco	15,0 ^a
β -lg nanoestruturada 1g/kg	15,0 ^a
β -lg nanoestruturada 2g/kg	15,0 ^a
β -lg nanoestruturada 5g/kg	14,9 ^a
β -lg nativa 1g/kg	15,0 ^a
β -lg nativa 2g/kg	15,0 ^a
β -lg nativa 5g/kg	15,0 ^a

a = estatisticamente iguais.

A adição da proteína nanoestruturada e nativa no iogurte também não variou significativamente a quantidade de sólidos dissolvidos segundo o Teste Tukey. Tal resultado é relevante, pois a não variância do Brix garante a não influência no sabor do produto fermentado, proporcionando a aplicabilidade da proteína nanoestruturada na indústria.

O teor de sólidos dissolvidos pode influenciar a viscosidade do iogurte. A textura adequada do produto pode ser obtida com a utilização de sólidos de origem láctea, como os concentrados proteicos (proteínas do soro) e/ou misturas de hidrocolóides (Fioravante 2001).

6. CONCLUSÃO

A adição da proteína β -lactoglobulina nanoestruturada e nativa não ocasionou mudanças significativas nas propriedades físico-químicas do iogurte líquido. As propriedades que garantem o sabor característico do produto fermentado como o pH, Brix, acidez titulável e viscosidade foram mantidas. Isso mostra a potencialidade da aplicação desse tipo de proteína em escala nanométrica na indústria, pois além de aumentar o valor nutricional do iogurte, devido as propriedades características únicas que compostos bioativos nanométricos possuem (melhor biodisponibilidade e absorção), agrega ainda mais valor ao produto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, L. D. (1997). "Tecnologia e aproveitamento do leite." Lavras: FAEPE: 149.
- Almeida, K. E. D., I. A. Bonassi and R. D. O. Roça (2001). "Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal." Food Science and Technology (Campinas): 187-192.
- Antunes, A. E., T. F. Cazetto and H. BOLINI (2005). "Viability of probiotic micro-organisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate." International Journal of Dairy Technology **58**(3): 169-173.
- Antunes, A. J. (2003). Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino, Editora Manole Ltda.
- Barros, R. M. d. S. (2011). "Nanoalimentos e nanotecnologias aplicadas a alimentos-riscos potenciais, necessidades regulatórias e proposta de instrumento para verificar opiniões sobre riscos potenciais à saúde e ao ambiente."
- Biscaia, I. M. F., C. C. Stadler and L. A. Pilatti (2004). "Avaliação das alterações físico-químicas em iogurte adicionado de culturas probióticas." Simpósio de Engenharia de Produção-SIMPEP **11**.
- Borwankar, R. P. (1992). "Food texture and rheology: a tutorial review." Journal of food engineering **16**(1-2): 1-16.
- Botaro, B. G., Y. V. R. d. Lima, A. A. Aquino, R. H. R. Fernandes, J. F. Garcia and M. V. d. Santos (2007). "Polimorfismo da beta-lactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino." Pesquisa Agropecuária Brasileira **42**: 747-753.
- Brandão, S. (1995). "Tecnologia da produção industrial de iogurte." Leite & Derivados **4**(25): 24-38.
- Bromberg, R. (2010). "Aspectos relacionados ao uso da nanotecnologia na."
- Carvalho, G. R. (2010). "A indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro." Embrapa Gado de Leite-Circular Técnica (INFOTECA-E).
- Carvalho, R., L. Fonseca, J. Coimbra, A. Mageste and I. Santos "ENCAPSULAÇÃO DE VITAMINA B2 EM NANOESTRUTURAS DE α -LACTOALBUMINA."
- da Silva, L. C., T. B. Machado, M. L. R. Silveira, C. S. da Rosa and S. M. M. Bertagnolli (2016). "Aspectos microbiológicos, pH e acidez de iogurtes de produção caseira comparados aos industrializados da região de Santa Maria-RS." Disciplinarum Scientia| Saúde **13**(1): 111-120.

da Silva, T. E. M., A. Premebida and D. Calazans (2012). "Nanotecnologia aplicada aos alimentos e biocombustíveis: interações sociotécnicas e impactos sociais| Risk analysis and regulatory frameworks for nanotechnology applied to food and biofuels, new socio-technical interactions and impacts on social life." Liinc em Revista **8**(1).

de Carvalho Martins, V., E. C. de Oliveira Braga, R. L. de Oliveira Godoy, R. G. Borguini, S. Pacheco, M. C. P. de Araújo Santiago and L. d. S. de Matos Nascimento (2016). "NANOTECNOLOGIA EM ALIMENTOS: UMA BREVE REVISÃO." Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia-ISSN: 1984-5693 **7**(2): 25.

Ferreira, H. S. and M. d. C. R. S. Varela (2009). "Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise."

Fioravante, P. (2001). "Combinação de ingredientes em iogurtes." Revista Flavors Magazine: 48-49.

Fox, P. F. and P. L. Mcsweeney (1998). "Dairy chemistry and biochemistry."

Fusco, C. (2009). Nanotecnologia para os outros: O mercado mundial de produtos que adotam as técnicas da nanotecnologia movimentara mais de 2 trilhoes de dolares ate 2015. Ate agora, o Brasil esta fora do jogo. Exame. **43**: 126+.

Giroto, J. and U. Pawlowsky (2001). "O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento." Brasil Alimentos **2**(5): 43-46.

Grasselli, M., A. Navarro, H. Fernández, M. V. Miranda, S. A. Camperi and O. Cascone (1997). "¿ Qué hacer con el suero del queso." Ciencia hoy **8**(43): 12-17.

Guedes Neto, L., L. Fonseca and M. Souza (2003). "Defeitos tecnológicos de leites fermentados." Revista Leite e Derivados **2**(74): 29-35.

Haraguchi, F. K., W. C. Abreu and H. d. Paula (2006). "Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana." Rev Nutr **19**(4): 479-488.

Martin-Diana, A., C. Janer, C. Peláez and T. Requena (2003). "Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria." International Dairy Journal **13**(10): 827-833.

Martin, A. F. (2002). Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácticas, Universidade de São Paulo.

Moraes, P. C. B. T. (2004). "Avaliação de iogurtes líquidos comerciais sabor morango: estudo de consumidor e perfil sensorial."

Moraes, R. D. (2006). "Refratometria." Teresina, Brasil.

Morr, C. and E. Ha (1993). "Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties." Critical Reviews in Food Science & Nutrition **33**(6): 431-476.

Penna, A., M. Oliveira and R. Baruffaldi (1997). "Análise de consistência de iogurte: correlação entre medida sensorial e instrumental." Food Science and Technology (Campinas): 98-101.

Perez, F. S., S. M. M. Bertagnolli, M. P. Alves and N. G. Penna (2016). "Nanotecnologia: aplicações na área de alimentos." Disciplinarum Scientia| Saúde **13**(1): 97-110.

Pinheiro, A., M. Cerqueira and A. Vicente (2013). "Nanotecnologia como ferramenta para produzir novos alimentos funcionais: vantagens e precauções." TecnoHospital: Revista de Engenharia e Gestão da Saúde **59**: 22-25.

Rao, M. (1986). "Rheological properties of fluid foods." Engineering properties of foods: 1-47.

Ribeiro, M. M., V. P. R. Minim, L. A. Minim, A. C. Arruda, E. B. Ceresino, H. C. F. Carneiro and P. de Aguiar Cipriano (2015). "Estudo de mercado de iogurte da cidade de Belo Horizonte/MG." Ceres **57**(2).

Robert, N. F. (2008). "Dossiê técnico: Fabricação de iogurte." Rede de tecnologia do Rio de: 2008.

Roco, M. C. (2003). "Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine." Current opinion in biotechnology **14**(3): 337-346.

Sakurai, K., T. Konuma, M. Yagi and Y. Goto (2009). "Structural dynamics and folding of β -lactoglobulin probed by heteronuclear NMR." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1790**(6): 527-537.

Santos, J. (1998). "Iogurte: um bom negócio se feito com profissionalismo." Indústria de Laticínios(18): 20-27.

Silva, S. V. d. (2007). "Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico."

Souza, G. (1990). "Fatores de qualidade do iogurte." Colet. Inst. Tecnol. Alim., Campinas **21**(1): 20-27.

Sozer, N. and J. L. Kokini (2009). "Nanotechnology and its applications in the food sector." Trends in biotechnology **27**(2): 82-89.

Tamime, A. and H. Deeth (1980). "Yogurt: technology and biochemistry." Journal of Food Protection **43**(12): 939-977.

Tamine et. al, A. (1991). "Bioquímica de la fermentación. En yogur Ciencia y Tecnología. Editorial Acribia." Zaragoza, España: 255-288.

Uskoković, V. (2007). "Nanotechnologies: What we do not know." Technology in society **29**(1): 43-61.

Zuñiga, A. D. G. (2003). "Estratégia de purificação das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina do soro de queijo."