



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

Centro de Ciências Exatas

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

MARIA BEATRIZ GÓES BARRETO

**HIDRÓLISE ÁCIDA DA LACTOSE EXTRAÍDA DO RESÍDUO  
DA MANTEIGA GHEE**

---

LONDRINA

2023

MARIA BEATRIZ GÓES BARRETO

# **HIDRÓLISE ÁCIDA DA LACTOSE EXTRAÍDA DO RESÍDUO DA MANTEIGA GHEE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa.Dra. Suzana Mali de Oliveira  
Co-orientadora: Profa. Dra. Janaina Mantovan

LONDRINA

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de  
Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B273h Barreto, Maria Beatriz Goes.

HIDRÓLISE ÁCIDA DA LACTOSE EXTRAÍDA DO RESÍDUO DA  
MANTEIGA

GHEE / Maria Beatriz Goes Barreto. - Londrina, 2023.

62f. : il.

Orientador: Suzana Mali.

Coorientador: Janaina Mantovan.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2023.  
Inclui bibliografia.

1. Tratamento hidrotérmico - Tese. 2. Ácido cítrico - Tese. 3. Ácido sulfúrico -  
Tese. 4. Resíduos lácteos - Tese. I. Mali, Suzana . II. Mantovan, Janaina . III.  
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

MARIA BEATRIZ GÓES BARRETO

# HIDRÓLISE ÁCIDA DA LACTOSE EXTRAÍDA DO RESÍDUO DA MANTEIGA GHEE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

## BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Suzana Mali de Oliveira  
BBTEC - Universidade Estadual de Londrina

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fabiana Guillen Moreira Gasparin  
BBTEC - Universidade Estadual de Londrina

---

Prof<sup>a</sup>. Dr Marcelo Rodrigues de Melo  
BBTEC - Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 08 de março de 2023.

*Dedico este trabalho à meus pais Maria Bernadete e Rogélio, e a minha irmã Rafaela, por sempre me apoiarem incondicionalmente e me incentivarem a seguir meus sonhos. Esta conquista também é de vocês!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Suzana Mali, pela paciência e ensinamentos nos anos que estive sob sua orientação, por ter acreditado e confiado em mim.

À minha Co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Janaína Mantovan, pelos ensinamentos e disponibilidade em ajudar nas análises laboratoriais.

A Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de realizar o curso com a estrutura e ferramentas necessárias. Assim como também, aos professores e funcionários do Departamento que colaboraram com este trabalho, direta ou indiretamente.

Às minhas amigas de Laboratório Dâmara, Mayara e Jaquellyne, por toda a disponibilidade em me ajudar, aos conselhos e apoio. A todos os meus amigos, que sempre me ampararam nos momentos difíceis durante o mestrado.

A toda minha família, em especial a minha amada mãe Maria Bernadete, que sempre me apoiou, acreditou no meu potencial e lutou muito para que eu pudesse estar aqui hoje. Não poderia deixar de agradecer à minha avó Irene, que apesar de não estar mais entre nós também faz parte de todas as minhas conquistas e para sempre estará em meu coração. Graças a essas duas mulheres, que me ensinaram o significado da força e perseverança eu cheguei até aqui.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte dessa jornada, minha eterna gratidão a todos!

BARRETO, Maria Beatriz Goes. **Hidrólise ácida da lactose extraída do resíduo da manteiga ghee**: 2023. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2023.

## RESUMO

Nos últimos anos, tem-se vivenciado uma elevada demanda por produtos lácteos sem lactose, devido ao aumento de consumidores com intolerância à lactose. Junto ao crescente consumo de produtos sem esse dissacarídeo, também há o aumento da quantidade de resíduos industriais derivados dos laticínios, que apresentam potencial de reaproveitamento, com redução do descarte inapropriado. Um resíduo pouco explorado é o resultante da produção da manteiga ghee, que é gerado após a coagulação da parte sólida não gordurosa do leite, permanecendo os demais componentes do leite em seu resíduo, como a lactose. Os usos tradicionais da lactose são insuficientes para atender a quantidade de resíduos gerados mundialmente, se fazendo necessário o estudo de novos meios de reaproveitamento da mesma. Deste modo, esse trabalho teve como objetivo desenvolver processo de hidrólise ácida da lactose proveniente do resíduo da manteiga ghee empregando-se a combinação de um método físico (tratamento hidrotérmico em autoclave) e químico (hidrólise ácida) em etapa única. O resíduo da manteiga ghee foi caracterizado quanto à sua composição centesimal, e fracionado para a obtenção de uma fração rica em lactose (FRL), que foi submetida ao processo de hidrólise ácida em comparação com uma amostra de lactose comercial pura. A hidrólise ácida foi realizada em autoclave, com pressão de 1,0 e 1,5 atm, e temperaturas de 121 e 127 °C, respectivamente, na presença de solução de ácido sulfúrico (1%) ou ácido cítrico (5 e 10%), por um período de 30 min. As amostras que resultaram na maior eficiência de hidrólise foram submetidas à pressão de 1,5 atm a 127 °C, combinadas ao ácido sulfúrico 1% e ácido cítrico 10%, resultando em eficiências de hidrólise para a FRL de 22,64 e 20,92%, e para a lactose comercial com valores de 92,83 e 69,88%, respectivamente. O processo de hidrólise ácida realizado em etapa única pela combinação do processo hidrotérmico na presença de ácidos se mostrou promissor como uma alternativa para o reaproveitamento de resíduos lácteos ricos em lactose.

**Palavras-Chaves:** Tratamento hidrotérmico; Ácido cítrico; Ácido sulfúrico; Resíduos lácteos.

BARRETO, Maria Beatriz Goes. **Acid hydrolysis of lactose extracted from ghee butter residue**: 2023. 61 f. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina-PR, 2023.

## ABSTRACT

In recent years, there has been a high demand for dairy products without lactose, due to the increase of consumers with lactose intolerance. Along with the increasing consumption of products without this disaccharide, there is also an increase in the amount of industrial residues derived from dairy products, which have potential for reuse, with reduction of an inappropriate disposal. One residue that has not been explored is the one resulting from the production of ghee butter, which is generated after the coagulation of the non-fatty solid part of the milk, remaining other components of the milk in its residue, such as lactose. The traditional uses of lactose are insufficient to meet the amount worldwide generated residues, making it necessary to study new ways to reuse it. Thus, this study aimed to develop a process of acid hydrolysis of lactose from ghee butter residue using a combination of a physical method (hydrothermal treatment in an autoclave) and a chemical method (acid hydrolysis) in a single step. The ghee residue was characterized according to its centesimal composition, and fractionated to obtain a lactose-rich fraction (FRL), which was subjected to the acid hydrolysis process compared to a pure commercial lactose sample. Acid hydrolysis was performed in an autoclave, with a pressure of 1.0 and 1.5 atm, and temperatures of 121 and 127 °C, respectively, in the presence of sulfuric acid (1%) or citric acid (5 and 10%) solution, for a period of 30 min. The samples that resulted in the highest hydrolysis efficiency were subjected to a pressure of 1.5 atm at 127 °C, combined with 1% sulfuric acid and 10% citric acid, resulting in hydrolysis efficiencies for the FRL of 22.64 and 20, 92%, and for commercial lactose with values of 92.83 and 69.88%, respectively. The single-step acid hydrolysis process by combining the hydrothermal process in the presence of acids showed to be a promising alternative for the reuse of lactose-rich dairy residues.

**Keywords:** Hydrothermal treatment; Citric acid; Sulfuric acid; Residues.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Via para a síntese da lactose	17
<b>Figura 2</b>	Estrutura química da lactose	25
<b>Figura 3</b>	Aparência do resíduo de ghee após 24h de repouso refrigerado	39
<b>Figura 4</b>	Aparência da fração rica em lactose extraída do resíduo ghee	40
<b>Figura 5</b>	Microscopia eletrônica de varredura da fração rica em lactose e da lactose comercial	41
<b>Figura 6</b>	Aparência dos hidrolisados obtidos a partir da fração rica em lactose e da lactose comercial	44
<b>Figura 7</b>	Espectros de FT-IR da fração rica em lactose e seus hidrolisados	47
<b>Figura 8</b>	Espectros de FT-IR da lactose comercial e seus hidrolisados	48
<b>Figura 9</b>	Resultados do crescimento celular de <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Lactobacillus salivarius</i> na FRL e no meio MRS.	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Lactases microbianas produzidas por diferentes microrganismos, incluindo seu pH e temperatura ótimos para hidrolisar a lactose	23
<b>Tabela 2</b>	Composição Físico-Química do resíduo ghee em base úmida	38
<b>Tabela 3</b>	Composição química da fração rica em lactose em base úmida	40
<b>Tabela 4</b>	Teor de glicose após hidrólise da fração rica em lactose nas diferentes condições de pressão, tipo e concentração de ácido	42
<b>Tabela 5</b>	Teor de glicose após hidrólise da lactose comercial nas diferentes condições de pressão, tipo e concentração de ácido	43
<b>Tabela 6</b>	Eficiência de hidrólise para as amostras submetidas aos diferentes tratamentos de hidrólise ácida	44
<b>Tabela 7</b>	Resultados de hidrólise ácida da lactose relatados na literatura	45
<b>Tabela 8</b>	Resultados das fermentações pelos microrganismos <i>L.acidophilus</i> e <i>L.salivarius</i>	49

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>15</b>
3.1	MANTEIGA GHEE	15
3.1.1	Resíduo da Manteiga Ghee	15
3.2	LACTOSE	16
3.2.1	Aspectos Nutricionais e Intolerância à Lactose	18
3.2.2	Processos de Hidrólise da Lactose	20
3.2.2.1	Hidrólise enzimática da lactose	22
3.2.2.2	Hidrólise ácida da lactose	25
3.2.2.3	Processos físicos na hidrólise da lactose	26
3.2.3	Aplicações da Lactose e Seus Derivados de Hidrólise	27
3.2.3.1	Aplicação da fração rica em lactose como fonte de carbono para microrganismos probióticos	28
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
4.1	MATERIAL	31
4.2	MÉTODOS	31
4.2.1	Caracterização do Resíduo Integral	31
4.2.1.1	Umidade	31
4.2.1.2	Cinzas	31
4.2.1.3	Lipídios	32
4.2.1.4	Proteínas	32
4.2.1.5	Carboidratos totais	32
4.2.1.6	Acidez titulável	32
4.2.2	Obtenção de uma Fração Rica em Lactose a partir do Resíduo Ghee	33
4.2.3	Caracterização da fração rica em lactose (FRL)	33
4.2.3.1	Glicose	33
4.2.3.2	Lactose	34
4.2.3.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	34

4.2.4	Hidrólise da Fração Rica em Lactose Extraída do Resíduo Ghee e da Lactose Comercial	34
4.2.5	Caracterização dos Hidrolisados	35
4.2.5.1	Determinação de glicose e eficiência de hidrólise	35
4.2.5.2	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)	35
4.3	POTENCIAL DE APLICAÇÃO DA FRAÇÃO RICA EM LACTOSE EXTRAÍDA DO RESÍDUO GHEE COMO FONTE DE CARBONO EM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO LÁTICA	35
4.3.1	Padronização do inóculo	35
4.3.2	Avaliação da fração rica em lactose como substrato de fermentação para <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Lactobacillus salivarius</i>	36
4.3.3	Dosagem de açúcares redutores e acidez titulável do meio fermentado	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>38</b>
5.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO RESÍDUO DE GHEE	38
5.2	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	39
5.3	MORFOLOGIA DE SUPERFÍCIE DA FRAÇÃO RICA EM LACTOSE EXTRAÍDA DO RESÍDUO GHEE.	40
5.4	HIDRÓLISE DA FRAÇÃO RICA EM LACTOSE E DA LACTOSE COMERCIAL	41
5.5	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)	46
5.6	POTENCIAL DE APLICAÇÃO DA FRAÇÃO RICA EM LACTOSE EXTRAÍDA DO RESÍDUO GHEE COMO FONTE DE CARBONO EM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO LÁTICA	48
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>52</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>62</b>
	ANEXO I – PEDIDO DE DEPÓSITO DE PATENTE	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os resíduos podem ser definidos como coprodutos obtidos durante a fabricação de um produto principal. Nos últimos anos, o aumento da capacidade de produção nos diferentes setores industriais, em especial na indústria de alimentos, aliado à diversidade de novos produtos, têm aumentado o interesse no aproveitamento e valorização dos resíduos gerados nas diferentes cadeias produtivas. Se alinhando desta forma ao conceito de economia circular, voltada à redução do desperdício de alimentos, compreendendo uma abordagem para reduzir, reutilizar, recuperar e reciclar nutrientes e energia (WANI *et al.*, 2022)

Um resíduo pouco explorado é o resultante da produção da manteiga ghee. Ghee ou manteiga clarificada é um produto que teve seu consumo aumentado com o decorrer dos anos, com previsão de crescimento de 8 milhões de toneladas até o ano de 2026, no mercado global (EXPERT MARKET SHARE, 2022; JANGHU *et al.*, 2014). O resíduo da manteiga ghee (RG) é gerado após a coagulação da parte sólida não gordurosa da gordura de leite durante o preparo da manteiga. Pode ser facilmente separado do produto por filtros ou clarificadores centrífugos contínuos (PATEL *et al.*, 2019).

O rendimento do sedimento de manteiga clarificada e dos resíduos dependem das matérias-primas e do método de preparação utilizado (PATEL *et al.*, 2019). A composição do RG apresenta um grande potencial de reaproveitamento pela sua abundância em lipídios, proteínas e lactose, se destacando entre os demais a lactose, por se tratar de um composto que vem sendo cada vez mais rejeitado pela indústria alimentícia.

A lactose é o único dissacarídeo presente no leite de mamíferos, representando aproximadamente 5,2% na composição do leite bovino, que é o leite de maior comercialização mundial (KATOCH *et al.*, 2021). Este carboidrato trata-se de um dissacarídeo formado por  $\beta$ -D-glicose e  $\alpha$ -D-galactose, unidos por uma ligação glicosídica do tipo  $\beta$ -1,4 (ROCHA; GUERRA, 2020).

Nos últimos anos tem-se vivenciado em nível mundial uma elevada demanda por produtos lácteos sem lactose ou com baixo teor, devido ao aumento de consumidores com intolerância à lactose, ou seja, incapazes de digerir este açúcar (DEKKER; KOENDERS; BRUINS, 2019). Em função disso, a lactose tem apresentado baixo valor comercial, não somente em decorrência a incidência de intolerância à

lactose, mas outros fatores cooperam para isto, como o seu fraco poder fermentescível quando comparado aos seus monossacarídeos constituintes (glicose e galactose), sua baixa solubilidade e o seu baixo poder adoçante (ROCHA; GUERRA, 2020).

Junto ao crescente consumo de produtos sem lactose, também há o aumento dos resíduos industriais derivados dos laticínios, sendo a maior parte destes resíduos constituídos de proteínas, lipídios, lactose, minerais e outros, de acordo com o tipo de produto lácteo produzido. Resíduos estes, que apresentam grande potencial de reaproveitamento, com redução do descarte inapropriado (MUNIRATHNAMMA; GUPTA; MEENA, 2017).

Os usos tradicionais da lactose na indústria são insuficientes para atender a demanda de resíduos gerados mundialmente, se fazendo necessário o estudo de novos meios de reaproveitamento. Uma alternativa seria o seu uso numa forma hidrolisada, a partir de seus monômeros (glicose e galactose), proporcionando mais opções de destino aos resíduos.

O processo de hidrólise já é empregado na indústria por ação de enzimas, porém, alguns gargalos tecnológicos da conversão enzimática têm sido relatados na literatura, dentre os quais o custo, tempo de reação, limitações na reutilização das enzimas, uso de tampões para o controle do pH, baixa estabilidade das enzimas, e a necessidade do uso de matéria-prima altamente pura. Dentre outras alternativas já descritas para a hidrólise da lactose são mencionados o emprego de ácidos orgânicos e/ou inorgânicos, assim como a combinação da hidrólise ácida associada a métodos físicos (CHENG *et al.*, 2020; CHENG; METZGER; MARTINEZ-MONTEAGUDO, 2020; GAJENDRAGADKAR; GOGATE, 2017).

Desse modo, esse trabalho teve como objetivo desenvolver um novo processo de hidrólise da lactose, com o intuito de reduzir custos, atender aos interesses industriais, e destinar os produtos da hidrólise para outras aplicações, diminuindo assim alguns impactos ambientais provenientes da elevada produção de resíduos lácteos ricos em lactose.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver processo de hidrólise ácida da lactose proveniente do resíduo da manteiga ghee empregando-se a combinação de método e químico em etapa única.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o resíduo da manteiga ghee quanto à sua composição centesimal (umidade, cinzas, lipídios, proteínas, carboidratos e lactose) e acidez;
- Obter de uma fração rica em lactose a ser empregada nos ensaios de hidrólise ácida;
- Padronizar o processo de hidrólise ácida da lactose extraída do resíduo, e de lactose comercial em comparação, empregando-se a combinação de tratamento hidrotérmico em meio ácido, na presença de um ácido orgânico (ácido cítrico) ou inorgânico (ácido sulfúrico);
- Caracterizar os hidrolisados resultantes da hidrólise ácida da lactose extraída do resíduo da manteiga ghee e da lactose comercial quanto aos seus teores de açúcares redutores;
- Avaliar o potencial de aplicação da fração rica em lactose extraída do resíduo da manteiga ghee como substrato para crescimento de bactérias probióticas.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 MATEIGA GHEE

Ghee ou manteiga clarificada é um ingrediente produzido a partir da clarificação da gordura do leite. É um produto lácteo bastante tradicional, muito popular em países como a Índia, onde é utilizado desde a antiguidade na culinária (RAY, 2019). Nos últimos anos teve seu consumo aumentado no ocidente, atingindo no mercado global um volume aproximado de 6,1 milhões de toneladas em 2020, com previsão de crescimento de 4,3% ao ano, com expectativa para atingir um volume de mais de 8 milhões de toneladas até 2026 (EXPERT MARKET SHARE, 2023; IMARC GROUP, 2023).

Esse produto pode ser preparado por processos artesanais e industriais distintos, através do aquecimento do leite, creme de leite ou manteiga a uma temperatura em torno de 100°C – 120°C (PENA-SERNA; RESTREPO-BETANCUR, 2020). Durante o seu processamento são eliminados quase em sua totalidade água, proteínas do leite, lactose, alguns minerais, lipídios e fosfolipídios (JANGHU *et al.*, 2014; PATEL *et al.*, 2019), os sólidos precipitam e a gordura é filtrada, obtendo assim a manteiga ghee. Essa manteiga é considerada uma fonte rica em ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis, além de ser uma opção aos consumidores intolerantes à lactose, uma vez que grande parte da lactose é removida no processamento, gerando um resíduo rico em lactose (RAY, 2019).

##### 3.1.1 Resíduo da Manteiga Ghee (RG)

O RG é o sedimento úmido, de cor marrom clara, formado após a coagulação da parte sólida não gordurosa do leite, existente no creme ou na manteiga, que surge durante o preparo do produto, na forma de pequenas partículas (JANGHU *et al.*, 2014). Pode ser facilmente separado do produto final por filtros ou clarificadores centrífugos contínuos. O rendimento do sedimento de manteiga clarificada e dos resíduos dependem das matérias-primas e do método de preparação (PATEL *et al.*, 2019).

Este resíduo representa um importante subproduto lácteo da indústria alimentícia, sendo muito utilizado para a produção de doces, produtos de panificação,

chocolates, balas, suplementos alimentares, dentre outros produtos (JANGHU *et al.*, 2014).

A literatura relata o uso do RG integral para diferentes aplicações. Sahasrabudhe *et al.* (2012) relataram o uso do RG como substrato para a produção de lipases por *Bacillus subtilis* e *Proteus spp*, pelo processo de fermentação em estado sólido. Laganathan *et al.* (2015) relataram o uso do resíduo em dietas de frangos de corte nas proporções de 5 a 30%, como fonte de energia e proteínas. Janghu *et al.* (2014) aplicaram o resíduo em diferentes produtos de confeitaria, que se mostraram estáveis ao armazenamento e elevada aceitabilidade sensorial após adição do resíduo. Hirpara *et al.* (2020) incorporaram o RG em bebida láctea, e observaram elevada aceitabilidade sensorial.

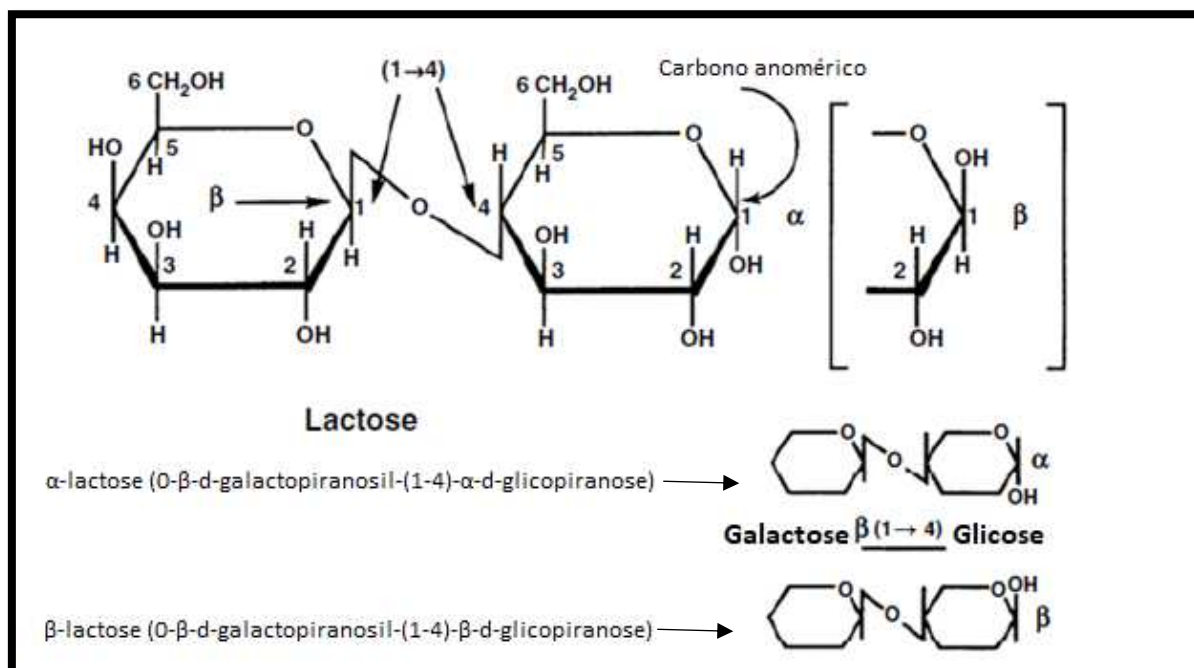
A composição do RG pode variar bastante em função da matéria-prima empregada, apresentando em sua composição lipídios (32% - 70%), proteínas (12% - 39%), umidade (8% - 30%), lactose (2% -18%) e cinzas (1% - 8%), podendo ser empregado como uma fonte potencial destes compostos, inclusive de lactose. Dos carboidratos contidos no RG, cerca de 70-80% compreendem à lactose, 15-20% à galactose e 5-10% à glicose (KUMAR *et al.*, 2017; WANI *et al.*, 2022).

### 3.2 LACTOSE

A lactose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) é um dissacarídeo formado por β-D-glicose e α-D-galactose unidas por uma ligação glicosídica do tipo β-1,4, derivando uma molécula de 4-O-β-D-galactopiranosil-D-glicopiranosose. A lactose apresenta capacidade redutora, pois o grupo presente no carbono anomérico da glicose não está envolvido com a ligação glicosídica, podendo dessa forma reagir com agentes oxidantes (ROCHA; GUERRA, 2020), como mostrado na Figura 1.

Essa molécula apresenta um centro quiral que pode exibir dois tipos de isômeros (Figura 1), os isômeros α-lactose (0-β-D-galactopiranosil-(1-4)-α-D-glicopiranosose) e β-lactose (0-β-D-galactopiranosil-(1-4)-β-D-glicopiranosose), que apresentam diferentes propriedades de solubilidade, cristalização, temperatura de fusão e rotação óptica (FOX, 2015; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, 2020).

Figura 1 – Estrutura química da lactose



Fonte: Adaptado de Fox (2015).

Em meio aquoso, a lactose sofre com a alternância entre as formas  $\alpha$  e  $\beta$ , processo esse chamado de mutarrotação. Em certo ponto, de acordo com a temperatura, as formas  $\alpha$  e  $\beta$  poderão atingir o estágio de equilíbrio. Por exemplo, sob temperatura de 25°C, o equilíbrio é atingido quando a solução alcançar 62,25% da isoforma  $\beta$  e 37,75% da isoforma  $\alpha$  (GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, 2020; PERRONE *et al.*, 2017). A diferença entre a quantidade de um isômero e outro acontece devido ao grau de solubilidade de cada isoforma, sendo a isoforma  $\beta$  solúvel até 93,5°C, enquanto  $\alpha$ -lactose se solubiliza acima dessa temperatura. A taxa de solubilidade da  $\beta$ -lactose é sete vezes maior em relação à da  $\alpha$ -lactose (ALTAMIMI *et al.*, 2019; GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, 2020).

Os cristais de  $\alpha$ -lactose são obtidos através da sua supersaturação em solução aquosa, permitindo que ela cristalize abaixo de 93,5°C, enquanto a cristalização da  $\beta$ -lactose ocorre acima desta temperatura (FOX, 2015; GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008; PEREIRA *et al.*, 2012). A maneira com que a lactose é cristalizada diz muito sobre a forma que os cristais adquirem. Quando a cristalização ocorre de forma forçada e rápida, são formados pequenos prismas paralelepipedais, porém quando se trata de um processo lento, formas variadas são identificadas, como piramidais e prismas com grandes dimensões, que apresentam certa complexidade

resultante da velocidade de crescimento, e que não apresentam um crescimento idêntico nas diferentes faces do cristal (ORDÍÑEZ *et al.*, 2005; YAMAUCHI *et al.*, 2014).

De forma geral, as condições normais para a cristalização da lactose envolvem um processo lento, que acarreta no aparecimento de grandes cristais em pequenas quantidades, rígidos e pouco solúveis, de possível identificação no paladar quando seu tamanho ultrapassa 16  $\mu\text{m}$  (ORDÍÑEZ *et al.*, 2005).

A principal fonte de lactose é o leite produzido pela maioria dos mamíferos, que apresentam entre 2 e 10% deste dissacarídeo em sua composição, dependendo da origem. O leite animal de maior comercialização mundial, o bovino, apresenta entre 4,4% e 5,2% de lactose, variando de acordo com a raça do animal produtor (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008).

A partir do leite dos bovinos são produzidos diversos produtos lácteos como queijos, iogurtes, cremes, manteiga, bebidas lácteas, dentre outros, e uma parte importante dos resíduos obtidos pela produção desses alimentos pode apresentar lactose (GUEVARA-ALVARADO *et al.*, 2020). A lactose apresenta características de baixa solubilidade em água (15 - 20%) e baixo poder adoçante, principalmente quando comparada a outros açúcares, mas trata-se da fonte energética de maior relevância nos primeiros meses da maior parte dos mamíferos, representando cerca de 40% do aporte energético diário nestes casos (GRENOV *et al.*, 2016; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, 2020).

### 3.2.1 Aspectos Nutricionais e Intolerância à Lactose

Produtos lácteos de origem animal contribuem significativamente para uma dieta balanceada, devido aos seus macro e micronutrientes, recomendando-se para adultos a ingestão diária de 1-3 porções (GILLE *et al.*, 2018). Contudo, nos últimos anos tem-se vivenciado, em nível mundial, uma elevada demanda por produtos lácteos sem lactose devido ao aumento de consumidores com intolerância à lactose, ou seja, incapazes de digerir este dissacarídeo. De forma geral, estes produtos apresentam as mesmas características nutricionais da sua versão com lactose, como cálcio e vitaminas (DEKKER; KOENDERS; BRUINS, 2019).

As enzimas  $\beta$ -galactosidases ou lactases (EC 3.2.1.23) são classificadas como glicosil-hidrolases. Essa enzima, é responsável pela hidrólise da lactose em glicose e galactose, o quê possibilita a absorção intestinal. A intolerância

à lactose trata-se de uma síndrome fisiopatológica causada pela redução ou perda da atividade desta enzima, expressa pelos enterócitos no intestino, mais especificamente na porção do jejuno (CATANZARO; SCIUTO; MAROTTA, 2021; MISSELWITZ *et al.*, 2013).

A atividade enzimática da lactase tem início no organismo humano por volta da oitava semana gestacional, e aumenta até o momento do nascimento, sendo necessária para a digestão da lactose durante o aleitamento materno, promovendo a absorção de açúcares e gerando energia (CATANZARO; SCIUTO; MAROTTA, 2021; SURI *et al.*, 2019)

Casos de intolerância à lactose congênita se não diagnosticados a tempo podem levar o recém-nascido à morte em casos extremos, em decorrência de desnutrição, desidratação e distúrbios hidroeletrolíticos graves (GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, 2020). Entre 2 e 12 anos de idade ocorre uma segregação natural dos indivíduos em dois grupos, os que apresentam lactase não persistente e os lactase persistentes, grupo este que inclui os indivíduos que mantêm a atividade dessa enzima mesmo após a infância. Porém, a intolerância também pode ser relacionada a fatores genéticos. A enzima lactase é codificada pelo gene LCT (50 kb), localizado no cromossomo 2, e a mutação desse gene em específico é relacionada a casos de intolerância (CATANZARO; SCIUTO; MAROTTA, 2021; SURI *et al.*, 2019).

A lactose não é absorvida pelo epitélio intestinal, apenas seus monossacarídeos (glicose e galactose) podem ser absorvidos por meio do transportador SGLT1, que é dependente de sódio ( $\text{Na}^+$ ). Dessa forma, na ausência e deficiência da enzima lactase ocorre o acúmulo de lactose no intestino, esta condição é responsável pelo aumento da carga osmótica no intestino grosso, promovendo a sua fermentação pela microbiota, o que resulta em uma alta taxa de produção de ácidos graxos de cadeias curtas e gases, como o hidrogênio ( $\text{H}_2$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e metano ( $\text{CH}_4$ ), causando dor abdominal, náusea, distensão abdominal, flatulência e diarreia (GILLE *et al.*, 2018; QUEIROZ *et al.*, 2021; SCHULZ; RIZVI, 2021; SURI *et al.*, 2019).

De acordo com Catanzaro, Sciuto e Marotta (2021), a prevalência estimada de intolerância à lactose em todo o mundo é de cerca de 65% da população adulta e a distribuição dos casos em todo o mundo é muito desigual, variando-se de cerca de 50% na América, 70% na Ásia, quase 100% na África, e 28% na Europa.

Em função disso, nos últimos anos a lactose tem apresentado baixo valor comercial, e além do aumento da incidência de intolerância à lactose em populações adultas, outros fatores contribuem para isto, como o seu fraco poder fermentescível quando comparado aos seus monossacarídeos constituintes (glicose e galactose), sua baixa solubilidade e o seu baixo poder adoçante (ROCHA; GUERRA, 2020). De acordo com Cheng, Metzger e Martinez-Monteagudo (2020) os preços da lactose caíram para cerca de US\$ 0,53 - 0,87 por quilo, o que está abaixo de seu custo de produção. Enquanto para 2023 o valor da lactose comercial entre US\$ 0.44 - 0.36 por quilo (SELINA WAMUCII, 2023).

Junto ao crescente consumo de produtos sem lactose, também há o aumento da quantidade de resíduos industriais derivados dos laticínios, a maior parte destes resíduos sendo constituídos de proteínas, lipídios, lactose, minerais e outros componentes de acordo com o tipo de produto lácteo a ser produzido. Resíduos estes, que apresentam grande potencial de reaproveitamento, com redução do descarte inapropriado (MUNIRATHNAMMA; GUPTA; MEENA, 2017). De acordo com Rocha e Guerra (2020), a principal rota alternativa para aumentar o valor comercial da lactose seria a produção de hidrolisados por meio de hidrólise da sua ligação glicosídica.

### 3.2.2 Processos de Hidrólise da Lactose

O aumento da poluição por resíduos lácteos, principalmente o soro do leite, tem se tornado um sério risco ambiental, uma vez que as unidades de tratamento de resíduos têm sido insuficientes para a quantidade de resíduos gerados, resultando em danos ambientais ao solo e poluição da água, causando a morte de peixes. Segundo Lindsay *et al* (2018), apenas nos EUA a quantidade de água, energia, e pegadas de carbono envolvidas com o despejo desses resíduos totaliza 320 milhões de toneladas de água, 2 bilhões de kW de energia e 500 mil toneladas de emissões de CO<sub>2</sub> por ano.

Atualmente, os usos tradicionais da lactose são insuficientes para atender a quantidade de resíduos gerados mundialmente, se fazendo necessário o estudo de novas alternativas para o seu reaproveitamento (CHENG; METZGER; MARTINEZ-MONTEAGUDO, 2020). De acordo com Schulz e Rizvi (2021), a lactose não tem valor comercial devido ao elevado número de pessoas que são intolerantes

à lactose na atualidade, mas a lactose pode ser convertida em muitos outros produtos de maior valor agregado.

Uma abordagem alternativa seria realizar a hidrólise da lactose presente nos resíduos, gerando moléculas de glicose e galactose, proporcionando novos destino à uma fração dos mesmos (GAJENDRAGADKAR; GOGATE, 2017). Dependendo das condições de hidrólise empregadas, pode haver simultaneamente uma fração da lactose sofrendo polimerização gerando galactooligossacarídeos (GOS), que são formados por transgalactosilação por ação da lactase durante a hidrólise da lactose. GOS são prebióticos não digeríveis que contêm uma longa cadeia de monômeros contendo uma molécula de glicose e algo em torno de 2 a 20 moléculas de galactose. GOS aumentam o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos no intestino de humanos, no entanto, a sua formação pode diminuir a eficiência da hidrólise se o objetivo único for a obtenção dos monossacarídeos (SCHULZ; RIZVI, 2021).

Adicionalmente, a hidrólise da lactose no soro de leite a granel simultaneamente com o processo de proteólise tem recebido atenção significativa por parte dos pesquisadores, embora alguns problemas práticos tenham surgido, principalmente a fácil contaminação microbiana como resultado da presença de um caldo altamente nutritivo (ROCHA; GUERRA, 2020).

O mercado global tem mostrado uma receptividade considerável à incorporação de compostos derivados de lactose na composição de produtos de alto valor agregado, principalmente devido às suas propriedades nutricionais, bioativas e tecnológicas, em especial alimentos e rações. Independentemente do tipo de hidrólise, química ou enzimática, ambos os processos podem ser aplicados praticamente em todos os tipos de produtos e resíduos contendo lactose, incluindo leite, soro de leite e permeado obtido a partir da ultrafiltração do soro de leite. Assim, a hidrólise da lactose tem oferecido à agroindústria uma alternativa para o desenvolvimento de novos produtos para nichos de mercado específicos ou com vantagens para produtores de leite e indústrias de laticínios (ROCHA; GUERRA, 2020; SCHULZ; RIZVI, 2021).

Dois processos para hidrolisar a lactose são a hidrólise enzimática (lactase ou  $\beta$ -galactosidase), processo mais empregado na indústria para a obtenção dos produtos sem lactose, e a hidrólise ácida. O uso de enzimas já é bastante estabelecido, no entanto, é um método de elevado custo, além da perda da viabilidade

da enzima com o tempo. Já a hidrólise ácida é um método convencional e barato, que emprega a combinação de ácidos e temperatura para que ocorra a hidrólise da lactose (COTÉ *et al.*, 2004).

### 3.2.2.1 Hidrólise enzimática da lactose

A lactase, ou  $\beta$ -galactosidase, é uma enzima que provém de diversas fontes, como plantas (amêndoas, pêssego, damasco, maçã), animais, leveduras, bactérias e fungos. A escolha entre qual fonte usar dependerá das condições da reação, de acordo com o produto desejado, como o pH e temperatura. Na Tabela 1 estão citadas algumas lactases de origem microbiana, seus valores ótimos de pH e temperatura. As lactases isoladas de fungos como *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*, leveduras como *Kluveromyces lactis*, e de bactérias como *Bacillus circulans* e *Bifidobacterium bifidum* são consideradas mais interessantes por serem obtidas de microrganismos GRAS (*Generally Recognized as Safe*), considerados seguros para uso na área de alimentos pelo FDA (*Food and Drug Administration*), agência norte-americana que regula a produção de alimentos nos Estados Unidos (ALMEIDA *et al.*, 2015; SAQIB *et al.*, 2017). Segundo a legislação brasileira, através da Resolução RDC n°53/2014, as lactases empregadas em alimentos devem ser de origem microbiana obtidas das seguintes fontes: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluveromyces fragilis*, *Kluveromyces lactis* (ANVISA, 2014).

As lactases de *Kluveromyces lactis* e *Kluveromyces fragilis* são largamente utilizadas pois o pH ótimo das suas lactases (Tabela 1) está na mesma faixa de pH do leite, e ainda, suas temperaturas ótimas são mais baixas do que outras fontes de enzima, ajudando a prevenir a deterioração do leite. Produtos lácteos acidificados, como o soro de leite ácido, comumente utilizam lactases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* na hidrólise da lactose devido ao seu pico de atividade se dar em valores de pH mais baixos (SCHULZ; RIZVI, 2021).

A lactase pode ser utilizada na sua forma livre, solúvel, ou na sua forma imobilizada, para uso em processos contínuos aplicados em reatores de membrana. Aplica-se essa técnica no leite e no soro, sem que seja necessário realizar tratamentos prévios, mas alguns fatores devem ser considerados, que incluem a concentração do substrato, o pH da operação, a temperatura máxima que a enzima suporta e o custo (HARJU *et al.*, 2012).

**Tabela 1** - Lactases microbianas produzidas por diferentes microrganismos, incluindo seu pH e temperatura ótimos para hidrolisar a lactose

Microrganismo		
Fungos	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)
<i>Aspergillus niger</i>	3,0 - 4,0	55 - 60
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,0 - 6,2	50 - 55
<i>Kluveromyces lactis</i>	6,5 - 7,3	35
<i>Kluveromyces fragilis</i>	6,6	37
Bactérias	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)
<i>Escherichia coli</i>	7,2	40
<i>Bacillus circulans</i>	6,0	60
<i>Bacillus subtilis</i>	6,5 - 7,0	50
<i>Bacillus sterarothermophilus</i>	5,8 - 6,4	65
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	6,2 - 6,6	55
<i>Streptococcus thermophilus</i>	7,1	55

Fonte: Adaptado de Schulz e Rizvi (2021)

O uso de enzimas ainda apresenta algumas limitações, além dos custos do processamento que são elevados e do longo tempo de hidrólise (GAJENDRAGADKAR; GOGATE, 2017). Em processos que envolvem longos períodos de hidrólise, o substrato pode ser refrigerado para que sua estabilidade química e microbiológica seja mantida, o que pode reduzir a atividade enzimática. Nestas situações, para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, a quantidade de enzima pode ser aumentada, assim como a temperatura, que deve ficar próxima à temperatura ótima da enzima, possibilitando ainda assim períodos de co-refrigeração para que seja mantida a integridade do substrato, diminuindo a atividade enzimática de forma que a enzima não seja inibida (HARJU *et al.*, 2012)

De acordo com Schulz e Rizvi (2021), a hidrólise enzimática pode ser realizada por batelada, antes ou depois da pasteurização do leite. Quando a hidrólise se dá antes da pasteurização, o emprego de baixas temperaturas desacelera o processo de hidrólise, uma vez que a temperatura ideal da enzima varia de 35 a 65 °C, e o tempo de incubação em baixas temperaturas (4 a 8 °C) geralmente varia de

12 a 24 horas, dependendo da enzima específica e da mudança ambiental. Após o processamento, parte da glicose e galactose podem ser ultrafiltradas para tornar o leite mais palatável para os consumidores. Assim que a hidrólise e a filtração são concluídas, o leite é pasteurizado e pode ser armazenado sob refrigeração por cerca de 2–3 semanas. As desvantagens deste processo incluem o tempo de hidrólise lento, o custo de energia para manter todo o leite a uma temperatura baixa e a incapacidade de recuperar a enzima após seu uso. Outro contratempo é a falta de controle sobre a interação da enzima com outros compostos, o que pode causar sabores indesejados no leite.

A via enzimática é geralmente empregada no leite ultrapasteurizado (UHT - *Ultra high temperature*). A enzima é adicionada ao leite em condições estéreis e mantida em temperatura ambiente por aproximadamente três dias, aumentando os custos de produção. Além disso, como este produto é hidrolisado, é mais suscetível ao escurecimento via reação de Maillard (SCHULZ; RIZVI, 2021)

A hidrólise enzimática da lactose pode ser realizada em processo contínuo através do emprego de enzimas imobilizadas. Neste caso o leite (ou outra matéria-prima a ser hidrolisada) é alimentado em um biorreator agitado, fixo ou de leito fixo contendo as enzimas imobilizadas. A imobilização enzimática traz benefícios indiscutíveis para a área de biocatálise industrial, e o mais importante é a reutilização das enzimas. Além disso, uma vez que não há enzima residual no leite, o produto final deste processo de hidrólise tem menos sabores indesejados, permitindo combinar os benefícios econômicos da catálise de baixa temperatura e a alta qualidade dos produtos sem lactose (CZYZEWSKA; TRUSEK, 2021).

Harju *et al.* (2012), relataram que a quantidade de enzima para hidrólise da lactose em leite estéril sob temperatura ambiente representa apenas 1% da quantidade necessária em condições não estéreis. Outro aspecto observado foi que, ao se limitar o grau da hidrólise de 80 a 90%, pode-se evitar o excesso de doçura adquirida pelo produto pelo aumento do hidrolisado de lactose.

Uma alternativa à hidrólise enzimática seria o desenvolvimento de processos de hidrólise ácida que sejam viáveis economicamente, e que possam ser empregados em resíduos da indústria de laticínios.

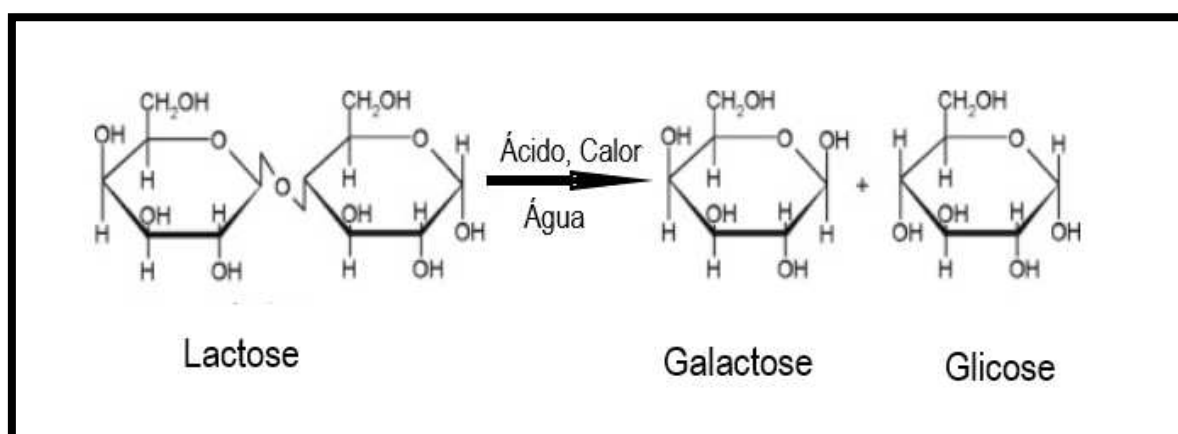
### 3.2.2.2 Hidrólise ácida da lactose

A hidrólise ácida da lactose resulta em um baixo custo industrial em relação ao mesmo processo utilizando enzimas, mas é uma alternativa pouco explorada na literatura, devido as condições necessárias para a operação, incluindo baixos valores de pH e temperaturas elevadas (SCHULZ; RIZVI, 2021; PEREIRA *et al.*, 2012).

A hidrólise ácida é uma reação que ocorre rapidamente, envolvendo soluções de pH baixo (1,0 - 2,0) e temperatura elevada (100° - 150°C), porém se trata de um processo que pode acarretar alterações sensoriais, no sabor e na cor dos alimentos. A hidrólise ácida é um método indicado para a hidrólise da lactose apenas na ausência da proteína, pois as mesmas são degradadas durante o processo, assim como também é preciso que seja feita a desmineralização do meio devido a inativação do ácido na presença dos sais minerais (GAJENDRAGADKAR; GOGATE, 2017; HARJU *et al.*, 2012), porém pode ser uma alternativa promissora, em especial para hidrólise da lactose extraída de resíduos lácteos.

O processo de hidrólise ácida ocorre a partir da catálise da reação por um ácido (HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), que libera prótons (H<sup>+</sup>) em solução, clivando a ligação glicosídica β-1,4 da molécula de lactose, o que resulta nas duas subunidades de monossacarídeos glicose e galactose, conforme observado na Figura 2. Pode ocorrer, assim como na hidrólise enzimática, em menores quantidades, a formação de oligossacarídeos como subprodutos da reação (GAJENDRAGADKAR; GOGATE, 2017).

**Figura 2** – Hidrólise ácida da lactose



Fonte: Gajendragadkar e Gogate (2017)

Coughlin e Nickerson (1975) identificaram que a hidrólise poderia ser catalisada por ácidos no soro do leite (5 % m/v) e soluções aquosas de lactose (5% m/v), com a solução de HCl em diferentes concentrações (0,5 – 3 mol/L), com a temperatura variando de 50 - 70°C. Foi observado que a formação de oligossacarídeos e o escurecimento da amostra pela reação de Maillard foram reduzidos nas reações em temperaturas abaixo de 100°C.

De acordo com Coté *et al.* (2004), a hidrólise ácida da lactose em resíduos lácteos pode apresentar um bom custo-benefício. Os autores relatam que hidrólise de soluções de lactose pura e da lactose contida no soro de leite é viável na presença do ácido sulfúrico e do ácido clorídrico, e em geral a quantidade de glicose liberada é menor que a da galactose, pois a glicose parece ser consumida em reações de caramelização e em outras reações na formação de compostos como furfural e hidroximetilfurfural, enquanto a galactose não participa destas reações.

De acordo com Schulz e Rizvi (2021), a lactose é resistente à hidrólise quando são empregados ácidos orgânicos, como é o caso do ácido cítrico, que poderia ser uma alternativa mais segura ao uso de ácidos inorgânicos. Gajendragadkar e Gogate (2017) relatam o emprego do ácido cítrico como uma alternativa para a hidrólise ácida da lactose. O ácido cítrico é um ácido tricarboxílico obtido de fonte renovável, biocompatível e de baixa toxicidade, que tem o seu emprego aprovado pela Agência Norte-americana que regula o setor de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos da América (Food and Drug Administration - FDA). No Brasil, o uso do ácido cítrico é aprovado pela ANVISA (Agência Nacional de vigilância Sanitária) como acidulante para uso em alimentos (PEREIRA *et al.*, 2022).

Adicionalmente, o emprego de combinações de processos físicos e químicos, com o objetivo de reduzir os tempos de reação pode ajudar no desenvolvimento de uma rota de produção econômica e com menor impacto ambiental, em especial na hidrólise de resíduos industriais ricos em lactose.

### 3.2.2.3 Processos físicos na hidrólise da lactose

O uso de processos físicos, e a sua combinação com processos químicos na hidrólise da lactose resulta na redução do tempo de reação e da eficiência

da hidrólise (GAJENDRAGADKAR; GOGATE, 2017), no entanto essa abordagem é muito pouca explorada na literatura.

De acordo com Gajendragadkar e Gogate (2017), a combinação do processo de ultrassonicação e do meio ácido para a hidrólise da lactose traz benefícios comprovados em termos de redução do tempo de reação e da eficiência da hidrólise, tanto para as operações em escala de laboratório, como em escala piloto. A aplicação de ultrassom aumenta as taxas de transferência de calor e massa entre os reagentes e o catalisador devido à geração de turbulência e ondas de choque, resultando na hidrólise da ligação covalente  $\beta$ -1,4-glicosídica, proporcionando taxas aumentadas de reação.

Um processo físico relatado na literatura como eficiente para a hidrólise de dissacarídeos é o processo hidrotérmico, considerado um processo de baixo impacto ambiental. Neste processo se utilizam temperaturas acima de 100 °C, sob pressão, e este processo pode ser realizado em escala de laboratório, empregando autoclaves. O processo pode ser realizado na ausência de reagentes, e na presença de água subcrítica, que é a água em temperatura acima do seu ponto de ebulição normal (100° C) e abaixo do seu ponto crítico (374° C), mas ainda em um estado líquido devido à pressão suficiente (GAGIĆ *et al.*, 2020).

A água subcrítica possui duas características únicas: uma constante dielétrica relativa baixa e um elevado produto iônico, havendo evidências de um alto teor de íons hidróxido e hidrogênio na água subcrítica, o que a faz efetiva na catálise de hidrólise de dissacarídeos como a lactose. Pode ser considerado um método hidrotérmico seguro e ecológico, que precisa de menor tempo de tratamento e seus produtos são livres de solventes perigosos em comparação à hidrólise com ácidos (GAGIĆ *et al.*, 2020; SHIMANOUCI *et al.*, 2019).

De acordo Shimanouchi *et al.* (2019), o processo hidrotérmico é eficiente para a hidrólise de dissacarídeos, e a combinação do processo com meio ácido resulta em aumento da eficiência da hidrólise, no entanto, o uso excessivo de ácidos deve ser evitado.

### 3.2.3 Aplicações dos Derivados de Hidrólise

Uma pequena fração da lactose obtida através de resíduos lácteos é utilizada como matéria-prima para a obtenção de novos produtos, o que se reflete no

seu valor de mercado. A hidrólise da lactose por ácidos resulta em xaropes ricos em açúcares com potencial de aplicação como substratos em processos fermentativos, porém devido a cor marrom que o produto adquire, isso pode ser um fator negativo dependendo da aplicação desejada (COTÉ *et al.*, 2004).

Para a produção de etanol, por exemplo, a cor do hidrolisado é irrelevante, mas a utilização de ácidos inorgânicos, em especial o ácido sulfúrico sob elevadas temperaturas, pode resultar na produção de compostos capazes de afetar negativamente o processo fermentativo, como furfural e hidroximetilfurfural, o que pode ser contornado através do emprego de condições mais brandas de hidrólise e o uso de ácidos orgânicos (COTÉ *et al.*, 2004).

Adicionalmente, a lactose pode ser reaproveitada não somente por hidrólise, mas também por reações de transfructosilação, transglicosilação, transgalactosilação, oxidação, redução isomerização e epimerização. Esses processos resultam em carboidratos funcionais, que não são obtidos naturalmente, e que apresentam maior valor comercial, como a lactulose, galactooligossacarídeos, ácido láctico, lactitol, ácido glucônico, ácido lactobiônico entre outros, garantindo seu reaproveitamento e redirecionamento (GAJENDRAGADKAR; GOGATE, 2017; SCHULZ; RIZVI, 2021; XIAO *et al.*, 2019).

### 3.2.3.1 Aplicação da fração rica em lactose como fonte de carbono para microrganismos probióticos

Os probióticos são definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) como microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

De acordo com Hanafi, Kamaruding e Shaharuddin (2022), os probióticos consistem de microrganismos não patogênicos e considerados GRAS pelo FDA, e sua viabilidade deve permanecer na faixa de concentração de  $10^6$ – $10^7$  UFC/g até atingirem seu local de ação. Os mecanismos de ação dos probióticos não são claros, no entanto, sabe-se que tem efeitos benéficos quando ingeridos em quantidades moderadas, mantendo a permeabilidade intestinal e controlando as respostas imunes das mucosas.

Nos últimos anos, dois novos conceitos relacionados aos probióticos têm sido bastante discutidos, o conceito de paraprobióticos, que foi proposto para indicar o uso de células microbianas de probióticos inativadas, ou suas frações celulares, e o conceito de pósbióticos, definidos como produtos solúveis ou metabólitos secretados pelos probióticos, e que apresentam benefícios fisiológicos ao hospedeiro, de forma direta ou indireta. Tanto os paraprobióticos, como os pósbióticos, têm sido relatados na literatura como produtos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro sem qualquer efeito negativo em potencial que poderia ocorrer em função da presença dos microrganismos vivos (KYE *et al.*, 2022; TEAME *et al.*, 2020).

Dentre os microrganismos probióticos mais estudados, se destacam as bactérias lácticas, que representam um grupo heterogêneo de espécies bacterianas largamente utilizadas na indústria de laticínios, com a finalidade de produção de alimentos fermentados (AĞAGÜNDÜZ *et al.*, 2022; ILANGO; ANTONY, 2021; TRINDADE *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2022).

As bactérias lácticas são classificadas de acordo com a sua morfologia em cocos ou bacilos, Gram-positivas, não esporuladas, oxidase e catalase negativas, e anaeróbicas aerotolerantes. Apresentam crescimento em diferentes temperaturas, são preferencialmente mesófilas, mas algumas linhagens são termófilas, sendo assim, crescem em uma faixa de 5 a 45°C, se adaptam com facilidade a ambientes ricos em nutrientes, e toleram meios ácidos e alcalinos (LUNARDI *et al.*, 2021; MADIGAN *et al.*, 2016).

Como principal ou único produto final da fermentação se tem o ácido láctico, contudo, as bactérias lácticas se dividem em dois grupos, as homofermentativas que tem como único produto o ácido láctico, e as heterofermentativas que além do ácido láctico, tem como principais produtos também o etanol e o CO<sub>2</sub> (MADIGAN *et al.*, 2016; SELLE; KLAENHAMMER, 2014).

O gênero *Lactobacillus* é o maior gênero dentre as bactérias lácticas, sendo composto por mais de 237 espécies, estando entre os probióticos mais utilizados, havendo evidências de que seus componentes celulares e metabólitos também são capazes de interagir com as células hospedeiras e desencadear efeitos similares às células viáveis (TEAME *et al.*, 2020).

As cepas de *Lactobacillus* são caracterizadas como bastonetes, e o seu metabolismo é classificado como homofermentativo, com temperatura ótima de

crescimento a 37°C. São muito utilizadas nas indústrias de laticínios no processo de fermentação e são nativas do trato gastrointestinal (SELLE; KLAENHAMMER, 2014). São muito utilizadas nas indústrias de alimentos como culturas *starter*, por terem capacidade de metabolizar a lactose. Também produzem enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas que atuam nos componentes presente em leites e queijos, promovendo propriedades sensoriais desejáveis aos laticínios, atuam aumentando o valor nutritivo por meio da síntese de aminoácidos essenciais, vitaminas e proteínas (LUNARDI *et al*, 2021).

Como uma alternativa para a produção de biomassa de cepas probióticas, a indústria alimentícia tem utilizado o soro do leite como um dos principais substratos para o crescimento dessas bactérias, por ser composto em sua maior parte por lactose, proteínas, sais, lipídios entre outros, o que valoriza muito este resíduo, além do baixo custo (COLARES, 2021).

A composição do RG, por possuir nutriente similares a composição do soro do leite, pode ser tão produtiva quanto se direcionada para a mesma finalidade, de produção de microrganismo lácteos. Encaminhando desse modo ainda mais resíduos lácteos favoráveis ao crescimento celular de probióticos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

O RG empregado neste trabalho foi gentilmente doado pela empresa Benni Alimentos (Londrina-PR). Lactose monohidratada foi obtida da Synth (Diadema-SP). Todos os reagentes analíticos empregados foram de grau analítico PA.

Dois cepas comerciais liofilizadas de *Lactobacillus* (Probiotical Spa, Novara, Piemonte, Itália) foram gentilmente doadas pela empresa Coana Importação e Exportação Ltda (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil): *Lactobacillus acidophilus* LA 02 ( $10^{11}$  UFC/g) e *Lactobacillus salivarius* BIO 6313 ( $10^{11}$  UFC/g).

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Caracterização do Resíduo

O resíduo foi previamente aquecido a 60 °C em banho maria, para facilitar a sua homogeneização antes de ser caracterizado quanto à sua composição centesimal.

##### 4.2.1.1 Umidade

A umidade foi determinada pela perda de massa da amostra após a secagem em estufa a 105°C até peso constante, na qual ocorreu a evaporação da água e substâncias voláteis, através de método oficial n° 925.10 da AOAC International (1995). A análise foi realizada em triplicata.

##### 4.2.1.2 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por meio da carbonização da amostra em forno mufla, com temperatura de 550 °C por 6 h, conforme descrito no método oficial n°923.03 da AOAC Internacional (1995). A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.2.1.3 Lipídios

A quantificação dos lipídios totais, foi realizado em triplicata, se deu pelo método de Gerber, no qual a amostra foi submetida ao tratamento com ácido sulfúrico e álcool isoamílico, e a leitura feita pela escala volumétrica no butirômetro de Geber (GHECKI *et al*, 2018). Pesou-se 5 g da amostra diretamente no butirômetro, em seguida, foi adicionado 5 mL de água destilada, 10 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, d= 1,825 g/cm<sup>3</sup>; LabSynth, Diadema-SP), e 1 mL de álcool isoamílico (LabSynth, Diadema-SP). O butirômetro foi vedado com uma rolha e agitado para homogeneização, em seguida foi acoplado na centrífuga de Gerber e centrifugado por 10 min. Ao final do processo, o butirômetro foi transferido para o banho-maria a 65 °C, onde permaneceu por 10 min. As etapas de centrifugação e incubação foram repetidas, e em seguida foi realizada a leitura pela escala volumétrica presente na coluna do butirômetro (BRASIL, 2014; GHECKI *et al*, 2018).

#### 4.2.1.4 Proteínas

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método Kjeldahl com fator de conversão para proteínas de 6,38 (análise de leites) conforme método oficial n° 920.152 da AOAC Internacional (2005). A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.2.1.5 Carboidratos totais

O teor de carboidratos totais foi calculado pela diferença entre 100 e a soma dos teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídios em porcentagem, como proposto nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

$$\text{Carboidratos totais (\%)} = 100 - (\text{umidade} + \text{cinzas} + \text{proteínas} + \text{lipídios})$$

#### 4.2.1.6 Acidez titulável

A determinação da acidez foi realizada através da quantificação de ácido láctico na amostra por titulação com solução de NaOH 0,1 mol/L, empregando-se fenolftaleína como indicador de pH (BRASIL, 2017).

#### 4.2.2 Obtenção da Fração Rica em Lactose a partir do Resíduo Ghee

O RG foi fracionado para obter-se uma fração rica em lactose (FRL), que foi empregada para os ensaios de hidrólise e potencial de fermentação. Para o fracionamento do resíduo, foi adaptado o método descrito por Patel e Murthy (2010):

- Inicialmente o resíduo foi aquecido à 60°C em um béquer até que as placas de gordura se homogeneizassem ao restante do material. Por se tratar de um material de difícil separação o mesmo foi diluído com água destilada 1:2 e deixado em repouso sob refrigeração em torno de 24h;

- Posteriormente a fração gordurosa do resíduo que estava localizada na fração superior foi removida, e o restante do resíduo foi novamente homogeneizado, e seu pH ajustado para 5,30 com solução de hidróxido de sódio (3 mol. L<sup>-1</sup>), permanecendo o material em repouso por mais 2 h em temperatura ambiente;

- Em seguida a amostra foi distribuída em tubos falcon e realizou-se uma centrifugação a 7168 g (8000 rpm) (Hettich, modelo universal 320R, Tuttlingen, Alemanha) por 30 min à 4°C. A fração gordurosa remanescente que foi para a superfície foi removida, e o material resultante foi considerado como a fração rica em lactose, que foi seca por liofilização (Operon, modelo FDU-7012, Coreia do Sul), e empregada para caracterização e aplicação nos ensaios de hidrólise e potencial de fermentação.

#### 4.2.3 Caracterização da fração rica em lactose (FRL)

A caracterização físico-química da FRL foi realizada conforme descrito a seguir:

##### 4.2.3.1 Glicose

O teor de glicose ( mg.mL<sup>-1</sup>) foi determinado por método colorimétrico empregando-se o kit enzimático glicose oxidase-peroxidase (Sigma-Aldrich GAGO20, Missouri, EUA). A leitura das absorbâncias a 540 nm das amostras e do padrão fornecido pelo kit enzimático foi realizada em espectrofotômetro Biochrom (Libra S22, Inglaterra) e o cálculo do teor de glicose conforme instruções do kit usado.

#### 4.2.3.2 Lactose

O teor de lactose foi determinado por método colorimétrico de acordo com as instruções do kit enzimático Sigma-Aldrich Lactose MAK017 (Missouri, EUA), em microplaca de 96 poços. A leitura das absorvâncias foi a 570 nm em espectrofotômetro (Bio Tek, modelo Eon™ 1211305, CA, EUA).

#### 4.2.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a caracterização das moléculas, as amostras da FRL e de lactose comercial secas foram revestidas por uma fina camada de ouro, com o auxílio do *Sputter Coater* BAL-TEC SCD 050, e em seguida foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200, Hillsboro, USA) sob uma tensão de 25,0 kV.

#### 4.2.4 Hidrólise da Fração Rica em Lactose Extraída do Resíduo Ghee e da Lactose Comercial

A hidrólise da FRL e da lactose comercial foi realizada pela combinação de métodos físicos e químicos, empregando-se tratamento hidrotérmico na presença de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) ou ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ), em diferentes condições, determinadas por Debiagi *et al* (2019) com adaptações.

Cerca de 5,50 g de cada amostra (FRL liofilizada ou lactose comercial) foram misturados com 50 mL de solução de  $H_2SO_4$  1 % m/v (Synth, Diadema, Brasil) ou  $C_6H_8O_7$  5 e 10 % m/v (Synth, Diadema, Brasil). Um ensaio controle foi realizado dispersando-se a mesma quantidade de cada amostra com água.

As amostras foram submetidas a tratamento em autoclave vertical (Prismatec, modelo CS, São Paulo, Brasil), em duas condições de pressão, 1,0 atm e 1,5 atm, em temperaturas de 121 °C e 127 °C, respectivamente, durante 30 min, baseado em ensaios preliminares.

Em seguida, as amostras correspondentes à FRL foram filtradas empregando-se filtro de membrana (Millipore Membrane, HA 0,45mm) e empregadas nas análises subsequentes.

## 4.2.5 Caracterização dos Hidrolisados

### 4.2.5.1 Determinação de glicose e eficiência de hidrólise

Os teores de lactose e de glicose nos hidrolisados foram determinados empregando-se as mesmas metodologias descritas anteriormente para a caracterização da FRL extraída do resíduo.

Considerando-se que a hidrólise de uma molécula de lactose gera 1 molécula de glicose e 1 molécula de galactose, a eficiência da hidrólise (%) foi calculada com base na massa de glicose quantificada nos hidrolisados em relação à massa inicial de lactose.

### 4.2.5.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

As amostras liofilizadas foram prensadas na presença de brometo de potássio (KBr) e analisadas em equipamento Shimadzu FTIR - 8300 (Kyoto, Japão), com a resolução do espectro em  $4\text{cm}^{-1}$  em uma faixa de  $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ .

## 4.3 APLICAÇÃO DA FRAÇÃO RICA EM LACTOSE EXTRAÍDA DO RESÍDUO GHEE COMO FONTE DE CARBONO EM FERMENTAÇÃO LÁTICA

### 4.3.1 Padronização do inóculo

As culturas de *Lactobacillus acidophilus* e o *Lactobacillus salivarius* liofilizadas foram inoculadas em meio MRS (Man, Rogosa & Sharpe), que contém em sua composição peptona ( $10\text{ g.L}^{-1}$ ); extrato de carne ( $10\text{ g.L}^{-1}$ ), extrato de levedura ( $5\text{ g.L}^{-1}$ ); glicose ( $20\text{ g.L}^{-1}$ ); tween 80 ( $1\text{ g.L}^{-1}$ ); citrato de amônia ( $2\text{ g.L}^{-1}$ ); acetato de sódio ( $5\text{ g.L}^{-1}$ ); sulfato de magnésio ( $0,1\text{ g.L}^{-1}$ ); sulfato de manganês ( $0,05\text{ g.L}^{-1}$ ); fosfato de potássio ( $2\text{ g.L}^{-1}$ ) (MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960).

Para a produção do inóculo fracos erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio MRS, foram incubados por 24 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sem agitação. Após a fermentação foi interrompida, por centrifugação ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $2800\text{ g}$ ,  $15\text{ min}$ ), e a massa celular foi suspensa em salina 0,9 %, e o processo de lavagem foi repetido por 2 vezes. A concentração celular foi obtida por turbidimetria em espectrofotômetro

(Biochrom, Libra S22, Inglaterra) a 620 nm, e os valores foram correlacionados com a curva de biomassa seca em  $\text{g.L}^{-1}$  (AMIRI *et al*, 2022).

#### 4.3.2 Avaliação da fração rica em lactose como substrato de fermentação

Para os testes de potencial de fermentação com a fração de FRL liofilizada, uma solução de concentração de  $10 \text{ mg. mL}^{-1}$  de FRL foi preparada, e o pH ajustado para 6,8 (pH do leite), e em Erlenmeyers de 50 mL foram adicionadas 20 mL desta solução. Como meio de controle de crescimento também foi preparado meio contendo o caldo MRS.

Os inóculos padronizados ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) foram transferidos para os frascos que foram incubados por 24 h a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , sem agitação. A interrupção dos cultivos foi realizada, por centrifugação a  $2800 \text{ g}$  por 15min a  $25^\circ\text{C}$ , e o sobrenadante empregado para dosagem de açúcares redutores e acidez titulável.

#### 4.3.3 Dosagem de açúcares redutores (AR) e acidez titulável do meio fermentado

O teor de AR foi determinado pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) usando uma curva padrão de glicose a  $1 \text{ mg. mL}^{-1}$ , com a seguinte equação da reta:  $y = 0,1694x - 0,0737$ ;  $R^2 = 0,995$ . As absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 540 nm (MILLER, 1959). A acidez titulável foi determinada conforme metodologia já descrita anteriormente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO RESÍDUO DE GHEE

Os resultados da composição do RG estão apresentados na Tabela 2. O teor de umidade observado foi de 38,6 %, valor acima dos valores relatados na literatura. De acordo com Wani *et al.* (2022), os teores de umidade no RG podem variar bastante, sendo mais comum valores entre 12 e 27%, e amostras com elevados teores de umidade podem indicar que nem toda a água foi evaporada na etapa de aquecimento da gordura do leite para a produção da ghee, resultando em um RG com elevado teor de água.

Os lipídios corresponderam à fração sólida majoritária presente no RG (44,3%), seguida dos carboidratos, proteínas e cinzas. Pode-se observar na Figura 3 a camada de lipídios formada na porção superior do RG após 24h de repouso refrigerado, tratando-se de um resíduo bastante gorduroso e de difícil homogeneização. Wani *et al.* (2022) relataram teores de lipídios com larga variação em diferentes amostras de RG, com valores entre 36 e 59%.

Os valores de lipídios, carboidratos, cinzas e acidez titulável observados neste trabalho estão bastante próximos dos valores relatados por Hirpara *et al.* (2020), que relataram que a composição do RG consiste em lipídios (47 %), proteínas (25 %), umidade (17 %), carboidratos totais (8 %), cinzas (3 %) e ácido láctico (0,22 %). Contudo, Patel *et al.* (2019) relataram que a composição do RG apresenta larga variação na sua composição dependendo da matéria-prima utilizada, e também do processo empregado para obtenção da ghee.

**Tabela 2** - Composição Química do resíduo ghee em base úmida.

<b>Componente</b>	<b>Teor (m/ m)</b>
Umidade (%)	38,6 ± 0,09
Cinzas (%)	2,5 ± 0,003
Lipídios (%)	44,3 ± 1,2
Proteínas (%)	3,0 ± 0,3
Carboidratos totais (%)	11,6 ± 0,6
Acidez titulável (% ácido láctico)	0,14 ± 0,002

Fonte: o próprio autor.

**Figura 3** – Aparência do resíduo de ghee após 24 h de repouso refrigerado.



Fonte: o próprio autor.

O teor de proteínas para o RG observado neste estudo (3,0%) se mostrou abaixo dos valores observados por outros autores, que relatam teores entre 12 e 39% (KUMAR *et al.*, 2017), porém de acordo com Wani *et al* (2022), o tratamento térmico empregado durante a produção da ghee pode resultar no decréscimo do nitrogênio solúvel devido à desnaturação induzida pelo calor, o que pode levar a um menor teor de proteínas quantificado.

## 5.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A remoção da fração gordurosa do RG conforme descrito no item 4.2.2 resultou em uma fração rica em lactose (FRL) (Figura 4), que foi empregada tanto nos ensaios de hidrólise ácida, quanto para os testes de avaliação do seu potencial de fermentação por microrganismos probióticos.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da composição química da FRL. Mesmo extraindo grande parte dos lipídios do RG, estes ainda corresponderam a 22,8% do material obtido.

O teor de glicose da FRL foi bastante baixo em comparação ao teor de carboidratos totais, (Tabela 3), e o teor de lactose correspondeu a cerca de 73% do teor de carboidratos totais, o que está de acordo com Wani *et al.* (2022), que relataram que cerca de 70 a 80% dos carboidratos totais presentes no RG correspondem à lactose.

**Figura 4** - Aparência da fração rica em lactose extraída do resíduo ghee



Fonte: o próprio autor.

**Tabela 3** – Composição química da fração rica em lactose em base úmida

<b>Componente</b>	<b>Teor (m/ m)</b>
Umidade (%)	44,0 ± 3,50
Lipídios (%)	22,80 ± 2,50
Proteínas (%)	3,80 ± 0,60
Carboidratos totais (%)	29,4 ± 2,82
Acidez titulável (%)	1,77 ± 0,01
Glicose (%)	1,60 ± 0,001
Lactose (%)	21,46 ± 0,04

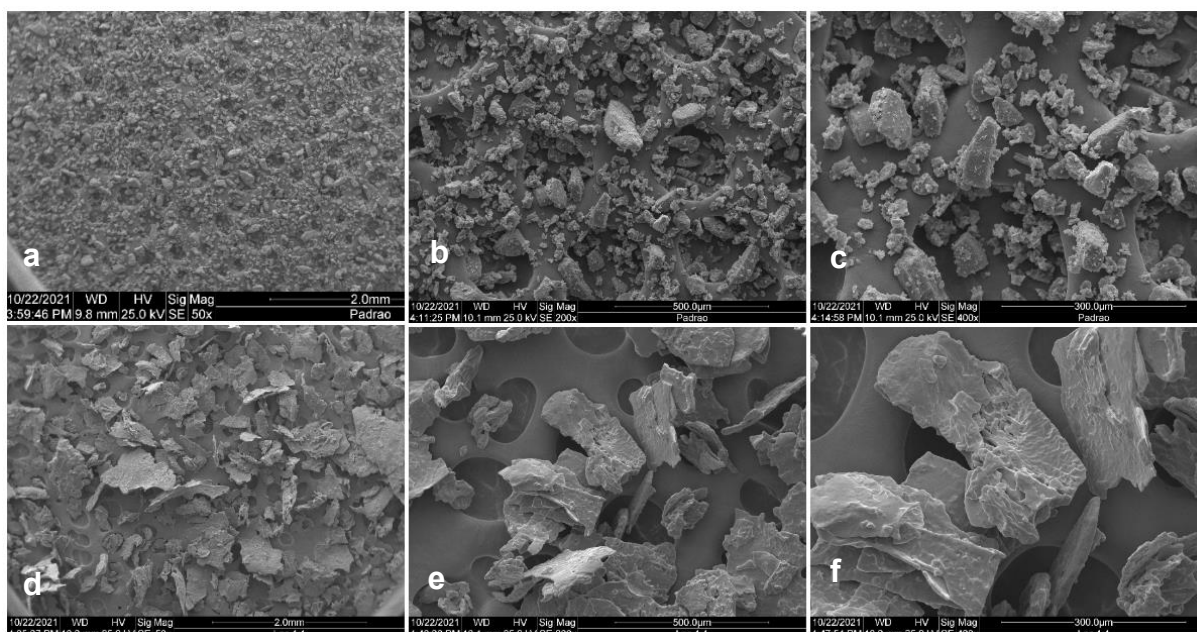
Fonte: o próprio autor.

### 5.3 MORFOLOGIA DE SUPERFÍCIE DA FRAÇÃO RICA EM LACTOSE EXTRAÍDA DO RESÍDUO GHEE.

De acordo com as imagens de MEV, pode-se observar que a lactose comercial (Figuras 5 a,b,c) se apresenta como partículas com diferentes tamanhos e formatos. Segundo Toledo *et al* (2020), essa não homogeneidade morfológica que é demonstrada em uma mesma amostra de lactose pode ser resultante do seu processo de produção, mais especificamente da sua cristalização, indicando que a mesma passou por múltiplos processos de secagem. As alterações morfológicas que ocorrem durante a cristalização da molécula de lactose podem afetar o produto final e suas propriedades físicas de solubilidade, fluidez e até mesmo o sabor (LARA-MOTA *et al*, 2022).

A FRL (Figuras 5 d,e,f) se apresenta no formato de partículas de maior tamanho, porém sem grande variação na sua morfologia de superfície, certamente resultantes do processo de secagem realizado por liofilização. Vale ressaltar que a FRL não apresenta na sua composição apenas a lactose, o que pode ter alterado a morfologia das partículas e afetado o processo de cristalização da lactose em comparação à lactose comercial.

**Figura 5** - Microscopia eletrônica de varredura da fração rica em lactose e da lactose comercial



Lactose comercial: amostras a,b,c, com os respectivos aumentos de 50, 200 e 400x. FRL: amostras d,e,f, com os respectivos aumentos de 50, 200 e 400x.

#### 5.4 HIDRÓLISE DA FRAÇÃO RICA EM LACTOSE E DA LACTOSE COMERCIAL

Os resultados referentes aos ensaios de hidrólise ácida da lactose presente na FRL e da lactose comercial estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Pode-se observar na Tabela 4 que o tratamento hidrotérmico provocou a hidrólise da lactose, como foi observado na amostra tratada apenas com água. Porém a hidrólise ácida foi mais eficiente, no geral, os teores de glicose nas amostras submetidas à hidrólise ácida foram maiores nas amostras submetidas ao tratamento hidrotérmico com pressão de 1,5 atm.

As amostras submetidas ao tratamento com ácido sulfúrico 1% (HT. AS 1%) e ácido cítrico 10% (HT. AC 10%) foram as que apresentaram os maiores

teores de glicose para a hidrólise da FRL do RG, e não houve diferença significativa no teor de glicose entre estas amostras. O processo realizado na presença de água resultou na menor liberação de glicose.

**Tabela 4** – Teor de glicose após hidrólise da fração rica em lactose nas diferentes condições de pressão, tipo e concentração de ácido.

Tratamento	Pressão de 1,0 atm	Pressão de 1,5 atm
	Glicose (mg.mL <sup>-1</sup> )	Glicose (mg.mL <sup>-1</sup> )
FRL	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001
HT. Água	0,400 ± 0,010 <sup>Da</sup>	0,500 ± 0,020 <sup>Ca</sup>
HT. AS 1%	3,000 ± 0,020 <sup>Ab</sup>	3,400 ± 0,050 <sup>Aa</sup>
HT. AC 5%	1,200 ± 0,040 <sup>Cb</sup>	1,500 ± 0,040 <sup>Ba</sup>
HT. AC 10%	2,000 ± 0,001 <sup>Bb</sup>	3,100 ± 0,001 <sup>Aa</sup>

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ); Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste t ( $p \leq 0,05$ ). HT. Água = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de água; HT.AS 1% = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de ácido sulfúrico 1%; HT. AC 5% = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de ácido cítrico 5%; HT. AC 10% = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de ácido cítrico 10%.

Fonte: o próprio autor.

Na hidrólise ácida da lactose comercial (Tabela 5), as amostras submetidas ao tratamento com ácido sulfúrico 1% (HT. AS 1%) sob 1,0 e 1,5 atm, e a amostra tratada com ácido cítrico 10% (HT. AC 10%) sob 1,5 atm foram as que apresentaram os maiores teores de glicose. O processo realizado na presença de água resultou na menor liberação de glicose.

As amostras submetidas à hidrólise ácida através da combinação do tratamento físico e químico em etapa única tiveram a eficiência de hidrólise (%) calculada com base no teor de glicose nos hidrolisados em relação à massa inicial de lactose contida nas amostras. A hidrólise de cada molécula de lactose (massa molar = 342,30 g.mol<sup>-1</sup>) resulta em 1 molécula de galactose (massa molar = 180,15 g.mol<sup>-1</sup>) e 1 molécula de glicose (massa molar = 180,15 g.mol<sup>-1</sup>) (GAJENDRAGADKAR; GOGATE, 2017). Os teores iniciais de lactose na FRL e na lactose comercial nas soluções a serem submetidas à hidrólise foram de 31,2 e 96,0 mg. mL<sup>-1</sup>, respectivamente, e foram estes teores empregados para os cálculos de eficiência de hidrólise, que estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 4** – Teor de glicose após hidrólise da lactose comercial nas diferentes condições de pressão, tipo e concentração de ácido.

Tratamento	Pressão de 1,0 atm	Pressão de 1,5 atm
	Glicose (mg.mL <sup>-1</sup> )	Glicose (mg.mL <sup>-1</sup> )
Lactose comercial	Não detectado	Não detectado
HT. Água	0,100 ± 0,040 <sup>Da</sup>	0,100 ± 0,040 <sup>Da</sup>
HT. AS 1%	44,000 ± 0,001 <sup>Aa</sup>	45,000 ± 0,070 <sup>Aa</sup>
HT. AC 5%	14,400 ± 0,02 <sup>Cb</sup>	22,500 ± 0,040 <sup>Ca</sup>
HT. AC 10%	19,500 ± 0,01 <sup>Bb</sup>	33,500 ± 0,005 <sup>Ba</sup>

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ); Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste t ( $p \leq 0,05$ ). HT. Água = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de água; HT.AS 1% = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de ácido sulfúrico 1%; HT. AC 5% = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de ácido cítrico 5%; HT. AC 10% = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de ácido cítrico 10%.

Fonte: o próprio autor.

Para todas as condições estudadas, exceto na presença de água, a hidrólise da lactose comercial pura resultou em maiores eficiências de hidrólise (Tabela 6), o que pode ser comprovado pelo maior teor de glicose nesta amostra em comparação com a FRL extraída do RG.

Pode-se observar que a condição que levou à maior eficiência de hidrólise foi o emprego de 1,5 atm de pressão em combinação com o ácido sulfúrico 1% (Tabela 6), com valores de eficiência de 22,64% para a FRL e de 92,83% para a lactose comercial.

O emprego do ácido cítrico, um ácido orgânico de fonte renovável, não se mostrou tão eficiente quanto o emprego do ácido sulfúrico, mesmo quando empregado em concentrações 5 e 10 vezes maiores. No entanto, o uso do ácido cítrico a 10% em processo hidrotérmico com 1,5 atm resultou em uma eficiência de hidrólise de 69,88% (Tabela 6), indicando que pode ser um processo promissor dependendo da amostra, o quê certamente merece maior investigação.

Na Figura 6 podemos observar a aparência dos hidrolisados obtidos. As amostras da FRL hidrolisada apresentaram um aspecto mais turvo, com tonalidade escura, e segundo Nomi *et al.* (2021), são aspectos característicos de hidrolisados derivados de laticínios, por conter açúcares redutores e aminoácidos, que são extremamente suscetíveis à reação de Maillard e caramelização em altas temperaturas, intensificando a produção de pigmentos marrons, enquanto a turbidez

é resultado da desnaturação das proteínas. Já a hidrólise realizada com a lactose pura, resultou em hidrolisados claros e translúcidos, pois como esperado, não é suscetível a reação de Maillard ou precipitação de proteínas, e a ligeira coloração amarelada (anteriormente transparente) ocorre devido ao emprego dos ácidos e da temperatura.

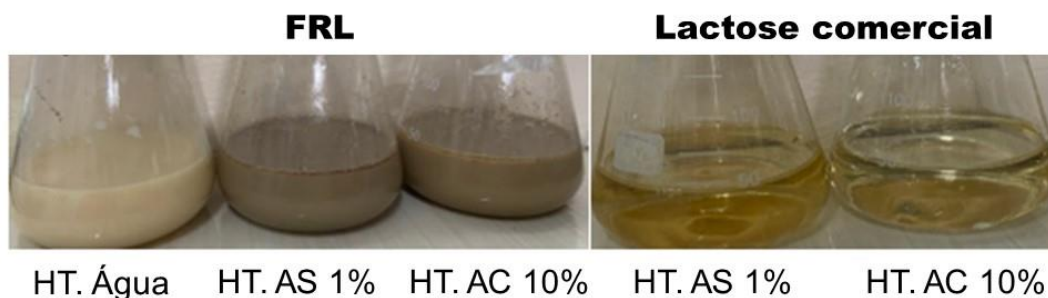
**Tabela 5** - Eficiência de hidrólise para as amostras submetidas aos diferentes tratamentos de hidrólise ácida.

Amostra	Eficiência de hidrólise (%)			
	FRL 1,0 atm	FRL 1,5 atm	Lactose comercial 1,0 atm	Lactose comercial 1,5 atm
HT. Água	2,98 <sup>Ad</sup>	3,42 <sup>Ac</sup>	0,12 <sup>Bd</sup>	0,30 <sup>Bd</sup>
HT. AS 1%	17,93 <sup>Ba</sup>	22,64 <sup>Ba</sup>	90,80 <sup>Aa</sup>	92,83 <sup>Aa</sup>
HT. AC 5%	7,86 <sup>Cc</sup>	10,30 <sup>Cb</sup>	30,07 <sup>Bc</sup>	46,90 <sup>Ac</sup>
HT. AC 10%	13,64 <sup>Db</sup>	20,92 <sup>Ca</sup>	40,58 <sup>Bb</sup>	69,88 <sup>Ab</sup>

Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). HT. Água = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de água; HT.AS 1% = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de ácido sulfúrico 1%; HT. AC 5% = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de ácido cítrico 5%; HT. AC 10% = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de ácido cítrico 10%.

Fonte: o próprio autor.

**Figura 6** – Aparência dos hidrolisados da fração rica em lactose e da lactose comercial.



Fonte: o próprio autor.

Na Tabela 6 estão apresentados resultados de hidrólise ácida obtidos por outros autores, indicando que os resultados obtidos neste trabalho foram satisfatórios, pois tanto o tempo de hidrólise (30 min), quanto a concentração dos ácidos empregadas foram menores em comparação aos outros autores.

No presente trabalho foi empregada a concentração de 1% de ácido sulfúrico (massa molar = 98 g.mol<sup>-1</sup>), que correspondeu a uma concentração de 0,102 mol. L<sup>-1</sup>, enquanto o ácido cítrico (massa molar = 192 g.mol<sup>-1</sup>) foi empregado nas concentrações de 5 e 10%, correspondendo a 0,260 e 0,520 mol. L<sup>-1</sup>, respectivamente, concentrações muito menores que as empregadas nos trabalhos descritos na Tabela 6.

**Tabela 6** – Resultados de hidrólise ácida da lactose relatados na literatura.

Referência	Condições empregadas				Eficiência de hidrólise
	Lactose (m/ v)	Ácido	Temperatura (°C)	Tempo (h)	
Coughlin e Nickerson (1974)	5%	2 mol.L <sup>-1</sup> HCl	70	6	100%
	5%	3 mol.L <sup>-1</sup> HCl	70	4	100%
Lin e Nickerson (1976)	30%	1 mol.L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60	24	79%
Vujicic, Lin e Nickerson (1977)	30%	1 mol.L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60	48	91%
Toba <i>et al.</i> (1985)	-	2 mol.L <sup>-1</sup> C <sub>2</sub> HCl <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	105	6	-
Barreto, Mantovan e Mali (2022)	1%	0,1 mol.L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	127	0,5	93%
	1%	0,5 mol.L <sup>-1</sup> C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	127	0,5	70%

HCl = ácido clorídrico; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = ácido sulfúrico; C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub> = ácido tricloroacético; C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> = ácido cítrico.

Fonte: o próprio autor

A redução da concentração de ambos ácidos só foi possível devido a combinação da pressão e temperatura elevadas, que atuaram acelerando o processo. Contudo, é importante ressaltar que para a conservação da amostra, a temperatura de hidrólise para dissacarídeos não deve exceder os 190°C, para que não sejam degradados termicamente (SHIMANOUCI *et al.*, 2019). A amostra da lactose comercial tratada com ácido sulfúrico 1% (HT.AS 1%) obteve uma maior eficiência de

hidrólise, indicando que a quantidade de prótons que se dissociaram do ácido inorgânico foi suficiente para desencadear a hidrólise da lactose, reduzindo o tempo da reação para apenas 30 min.

Segundo Shimanouchi *et al.* (2019), o acúmulo dos prótons faz com que o pH do meio diminua, sendo este o principal fator que fornece a energia iônica necessária para o desencadeamento da hidrólise sob condições hidrotérmicas. Dessa forma, a combinação dos processos físico e químico resultou em uma redução do tempo de hidrólise e das quantidades de ácidos empregadas, o que consequentemente levou à uma redução do custo do processo.

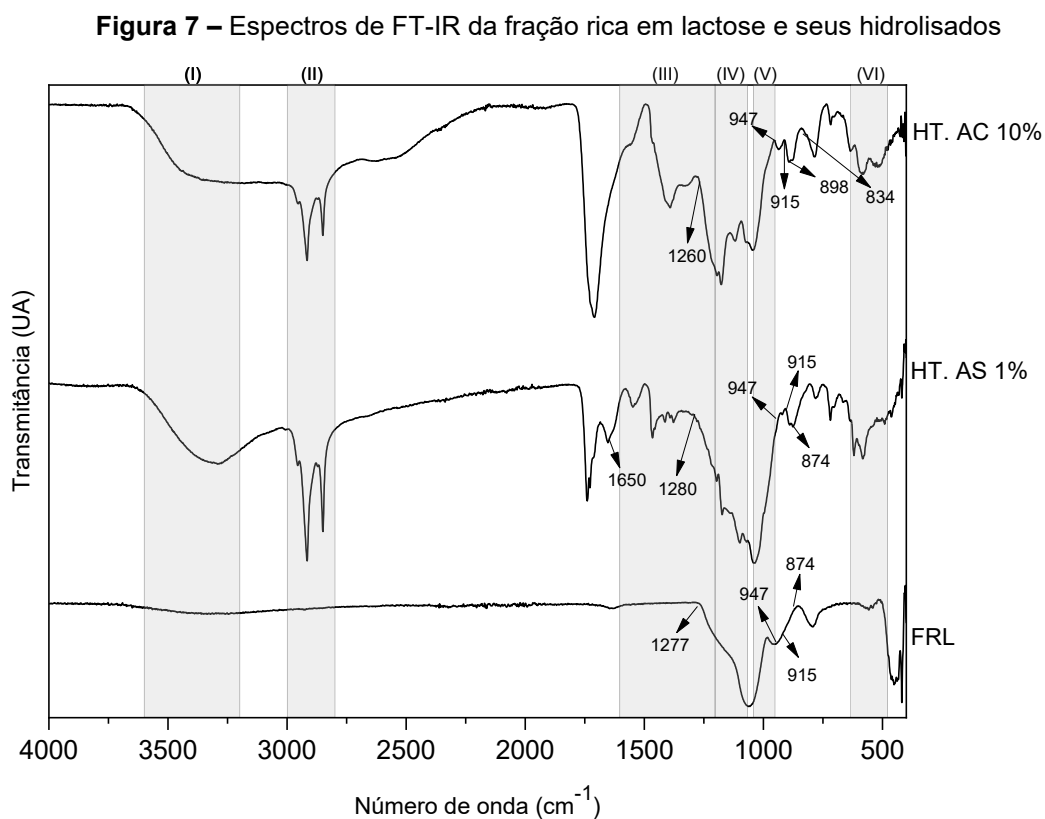
## 5.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

As diferentes amostras da FRL e da lactose comercial foram analisadas por FT-IR, e seus espectros estão apresentados nas Figuras 8 e 9, respectivamente. Vibrações características das moléculas de lactose foram identificadas: (I) vibração simétrica e alongada do grupo hidroxila (OH) com bandas entre 3600 – 3200  $\text{cm}^{-1}$ ; (II) alongamentos dos grupos CH que são presentes nas moléculas de glicose e galactose com bandas entre 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ ; (III) grupos CH, OH e  $\text{CH}_2$  que apresentam bandas entre 1600-1200  $\text{cm}^{-1}$ ; (IV) bandas em 1.200-1.070  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas às vibrações assimétricas de C–O–C da ligação glicosídica; (V) estiramento do grupo C–O da ligação glicosídica entre 1142-953  $\text{cm}^{-1}$ , e (VI) deformação da ligação glicosídica nas bandas entre 633-477  $\text{cm}^{-1}$ . Já a banda em 1650  $\text{cm}^{-1}$ , é relacionada a flexão dos grupos OH das moléculas de água cristalizada (KIRK; DANN; BLATCHFORD, 2009; LISTIOHADI *et al.*, 2009).

Adicionalmente López-Pablos *et al* (2018) relatam que a  $\alpha$ -lactose apresenta bandas específicas em 915, 898 e 874  $\text{cm}^{-1}$ , as bandas de  $\beta$ -lactose estão localizadas em 947,890 e 834  $\text{cm}^{-1}$  e a lactose amorfa pode apresentar bandas em 1.260, 900 e 875  $\text{cm}^{-1}$ .

López-Pablos *et al* (2018) também observaram que há diferença nos espectros entre a lactose amorfa e a cristalina, a lactose amorfa apresenta bandas mais amplas e menos intensas, já as bandas da lactose cristalina são bem definidas. Com base nessas informações, podemos identificar nas amostras da FRL, e nos hidrolisados HT.AS 1% bandas de  $\alpha$ -lactose em 915 e 874  $\text{cm}^{-1}$ , e na HT.AC 10% em 915 e 898  $\text{cm}^{-1}$  com intensidade de vibração mais baixa (Figura 7). Bandas de  $\beta$ -

lactose em  $947\text{ cm}^{-1}$  podem ser observadas em todas as amostras de hidrolisados, com exceção da amostra HT.AC 10% que obteve a banda de  $\beta$ -lactose em  $834\text{ cm}^{-1}$ . Já as vibrações para lactose amorfa foram mais expressivas nos espectros de HT.AS 1% e HT.AC 10%, com bandas em  $1280$  e  $1260\text{ cm}^{-1}$ .



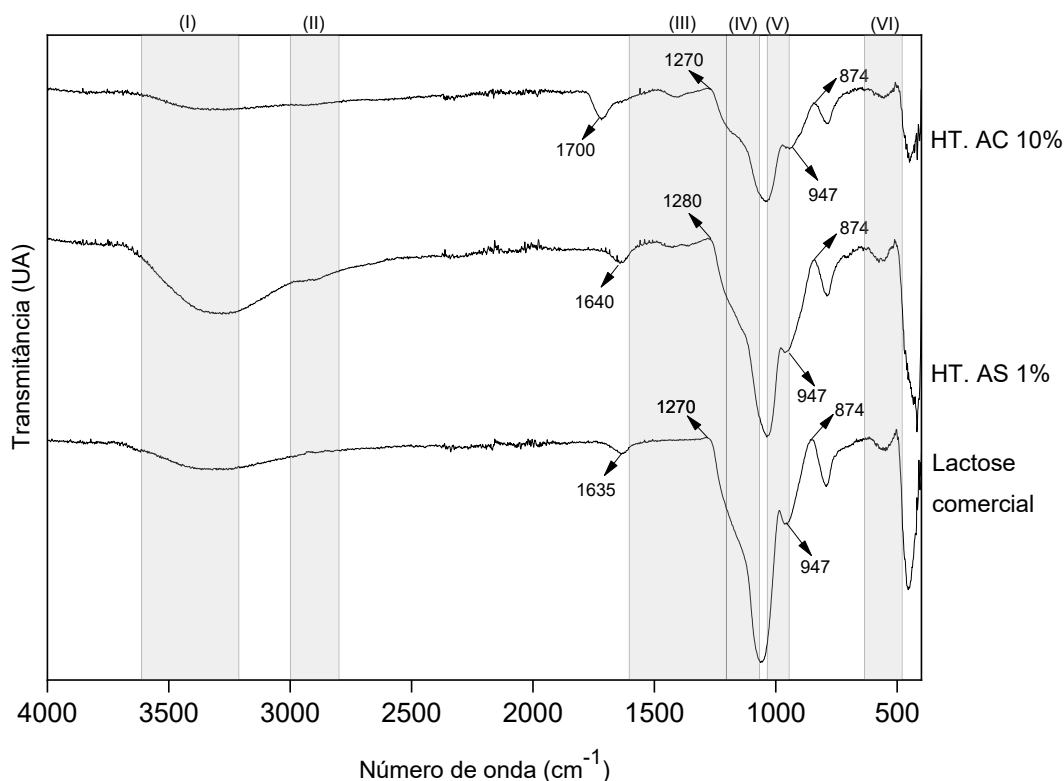
FRL = amostra da fração rica em lactose sem tratamento; HT.AS 1% = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de ácido sulfúrico 1%; HT. AC 10% = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de ácido cítrico 10%.

Fonte: o próprio autor.

A Figura 8 apresentou bandas de vibrações bem definidas em  $874\text{ cm}^{-1}$ , indicando a presença da  $\alpha$ -lactose, com menor intensidade no tratamento com HT.AC 10%, e em todas as amostras as bandas para  $\beta$ -lactose obtiveram menor intensidade em  $947\text{ cm}^{-1}$ .

Pequenas vibrações de lactose amorfa foram localizadas em  $1280$  e  $1270\text{ cm}^{-1}$ . Nota-se também, que as amostras relacionadas a lactose comercial obtiveram espectros bastante similares entre si, o que pode estar relacionada a pureza da amostra, sem que haja interferências de outros componentes.

**Figura 8** – Espectros de FT-IR da lactose comercial e seus hidrolisados.



Lactose comercial = amostra sem tratamento; HT.AS 1% = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de ácido sulfúrico 1%; HT. AC 10% = amostra submetida ao tratamento hidrotérmico na presença de ácido cítrico 10%.

Fonte: o próprio autor.

## 5.6 POTENCIAL DE APLICAÇÃO DA FRAÇÃO RICA EM LACTOSE EXTRAÍDA DO RESÍDUO GHEE COMO FONTE DE CARBONO EM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO LÁTICA

A FRL foi usada como meio de cultivo bacteriano para avaliar o seu potencial como substrato em processo de fermentação láctica. Na Tabela 8 são apresentados os resultados obtidos na fermentação pelos microrganismos *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus salivarius*.

A concentração inicial de AR determinada no meio FRL foi de  $48 \text{ g.L}^{-1}$ , e foi observado que houve o consumo de açúcares redutores presentes na amostra, como a lactose, que é o principal açúcar presente na FRL. O consumo de AR pelo *Lactobacillus acidophilus* foi de  $4,18 \text{ g.L}^{-1}$ , enquanto o *Lactobacillus salivarius* consumiu  $8,25 \text{ g.L}^{-1}$ , correspondendo a 9 e 17% do total, respectivamente (Tabela 8).

**Tabela 7** - Resultados das fermentações pelos microrganismos *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus salivarius* em meio MRS e na FRL.

Parâmetros	FRL		Meio MRS	
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. salivarius</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. salivarius</i>
AR (g.L <sup>-1</sup> )	43,82 ± 0,99	39,75 ± 0,55	7,49 ± 0,21	4,55 ± 0,27
pH	4,87 ± 0,03	6,35 ± 0,006	3,62 ± 0,006	3,57 ± 0,006
Acidez (%)	0,019 ± 0,001	0,029 ± 0,0005	0,10 ± 0,0003	0,10 ± 0,001

AR = açúcares redutores.

Fonte: o próprio autor.

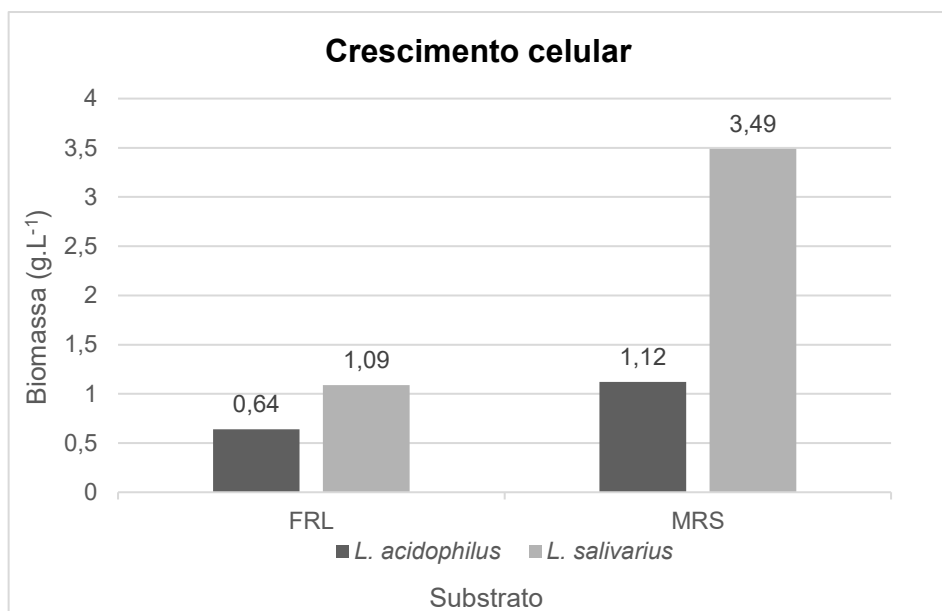
Para as fermentações os meios tiveram o seu pH ajustado para 6,8 como pH inicial, para que atingisse uma faixa similar ao pH do leite bovino, e observou-se que o pH diminuiu nos ensaios de fermentação (Tabela 8). Contudo, o meio FRL com inóculo de *Lactobacillus salivarius* ficou menos ácido (pH 6,35) que do *Lactobacillus acidophilus* (pH 4,87). Cante *et al* (2020) afirmam que os microrganismos fermentadores utilizam os carboidratos como sua principal fonte de carbono para a produção do ácido láctico, sendo este o responsável pela redução do pH.

A produção de ácido láctico variou entre as espécies, com valores de 0,019 % para o *Lactobacillus acidophilus*, e 0,029% para o *Lactobacillus salivarius* (Tabela 7), e um baixo crescimento foi observado para ambos os microrganismos, de 0,64 e 1,09 g. L<sup>-1</sup> (Figura 9) respectivamente, o que pode ser um indicativo de que o meio não apresentava todos os nutrientes necessários para que ocorresse uma fermentação eficiente, uma vez que essas bactérias fazem a conversão exclusiva das hexoses em ácido láctico.

Em comparação à fermentação realizada na FRL, o consumo de açúcares no meio MRS foi maior, considerando-se que o teor inicial de açúcares redutores foi de 20 g. L<sup>-1</sup>, observou-se um consumo de 63% da glicose presente no meio para o *Lactobacillus acidophilus*, e de 77% para o *Lactobacillus salivarius* (Tabela 7), e isso se refletiu em menores valores de pH, maior acidez e biomassa neste meio. Segundo Hayek *et al* (2019), um mineral extremamente necessário para o crescimento de grande parte das bactérias lácticas é o sulfato de manganês, que originalmente é incluído no meio MRS, sendo essencial para o crescimento e atividade

metabólica. O  $Mn^{+2}$  também atua nos radicais endógenos do oxigênio eliminando o  $O_2$ , que desfavorece o ambiente anaeróbico.

**Figura 9** - Resultados do crescimento celular de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus salivarius* na FRL e no meio MRS.



Biomassa (g.L<sup>-1</sup>) = cálculo de biomassa produzida a partir da curva de DO e peso seco

De acordo com esses dados foi possível identificar que houve o consumo de açúcares no meio contendo a FRL em pequenas quantidades, mas pela falta de outros nutrientes o crescimento celular não foi tão satisfatório quanto à observada para o meio MRS, que foi de 1,12 g. L<sup>-1</sup> para o *Lactobacillus acidophilus* e 3,49 g.L<sup>-1</sup> para o *Lactobacillus salivarius* (Figura 9), sendo necessário alguns ajustes em trabalhos futuros para a obtenção de melhores resultados.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de hidrólise ácida pela combinação de um método físico e químico em etapa única se mostrou eficiente para a hidrólise da lactose oriunda do resíduo da manteiga ghee e da lactose pura. As condições que obtiveram a melhor eficiência foram a pressão de 1,5 atm a uma temperatura de 127 °C combinada ao ácido sulfúrico 1%, que apresentou eficiência de 22,64% para a FRL e de 92,83% para a lactose comercial.

O emprego do ácido cítrico, não foi tão eficiente quanto o ácido sulfúrico, que nas mesmas condições de uso obteve uma eficiência de 20,92% para a FRL e 69,88% para a lactose comercial, indicando uma maior resistência da lactose à hidrólise, no entanto, o uso do ácido cítrico se mostrou uma alternativa bastante promissora para a hidrólise da lactose pura.

O emprego da FRL como substrato em processo fermentativo se mostrou promissor, sendo necessários maiores estudos e ajustes para a aquisição de melhores resultados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AĞAGÜNDÜZ, D.; SAHIN, E. Ö.; AYTEN, S.; YILMAZ, B. E. G.; RUSSO, P.; SPANO, G.; ÖZOGUL, F. Lactic acid bacteria as pro-technological, bioprotective and health-promoting cultures in the dairy food industry. **Food Bioscience**, v.47, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101617>.

ALMEIDA, K. N.; ALVIM, T.C.; SOUZA, A.R.M.; LACERDA, G. E.; ALVIM, F.A.L.S.; ALVIM, J.C. Hidrólise enzimática da lactose de permeado de soro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 55 - 63, 2015. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v70i2.363>.

ALTAMIMI, M. J. WOLFF, K.; NOKHODCHI, A.; MARTIN, G.P.; ROYALL, P.G. Variability in the  $\alpha$  and  $\beta$  anomer content of commercially available lactose. **International Journal of Pharmaceutics**, v.555, p. 237-249, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.061>.

AMIRI, S.; MOKARRAM, R.R.; KHIABANI, M.S.; BARI, M.R.; KHALEDABAD. Characterization of antimicrobial peptides produced by *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium lactis* BB-12 and their inhibitory effect against foodborne pathogens. **Food Science and Technology**, v.153, p. 1-10, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112449>.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. Gaithersburg: AOAC International, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of the Association of the Agricultural Chemists. 16.ed. Washington, DC, 1995. v.2, 1094p.

BRASIL, Leis, decretos, etc. Instrução Normativa nº 13 de 29 de junho de 2005. Diário Oficial da União. Brasília, 30 de junho de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal**. 1. ed. Brasília: MAPA, 2017. 140 p. ISBN 978-85-7991-111-8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Laboratório Nacional Agropecuário. Laboratório de Produtos de Origem Animal. **Determinação de Lipídios em Leite Fluido pelo Método de Gerber**. 2014. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/credenciamento-e-laboratorios-credenciados/legislacao-metodos-credenciados/arquivos-metodos-da-area-poa-iqa/met-poa-03-03-lipidios-em-leite-fluido.pdf/@@download/file/met-poa-03-03-lipidios-em-leite-fluido.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 53, de 7 de outubro de 2014, dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em

preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 out. 2014.

CANTE, R.C.; GALLO, M.; NIGRO, F.; PASSANNANTI, F.; SALAMEH, D.; BUDELLI, A.; NIGRO, R. Lactic fermentation of cooked navy beans by *Lactobacillus paracasei* CBA L74 aimed at a potential production of functional legume-based foods. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 98, n.1, p. 1955-1961, 2020. 10.1002/cjce.23817

CATANZARO, R.; SCIUTO, M.; MAROTTA, F. Lactose intolerance: An update on its pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Nutrition Research**, v.89, p.23-34, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2021.02.003>.

CAVALCANTI, A. L. OLIVEIRA, F.K.; SILVA PAIVA, P.; DIAS, M.V.R., PEREIRA DA COSTA, S.K.; VIEIRA, F.F. Determinação dos sólidos solúveis totais (°BRIX) e pH em bebidas lácteas e sucos de frutas industrializados. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**. v.6, n.1, p.57-64, 2006.

CHENG, S.; HUMMEL, M.; DAHAL, B.; GU, Z.; KHAREL, P.; MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, S. A two-step process for the synthesis of sweetening syrup from aqueous lactose. **LWT- Food Science and Technology**, v.117, 108659, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108659>.

CHENG, S.; METZGER, L.; MARTINEZ-MONTEAGUDO, S. One-pot synthesis of sweetening syrup from lactose. **Scientific Reports**, v.10, n.1, 2020. 10.1038/s41598-020-59704-x.

COLARES, H.C. **Otimização da produção de biomassa por isolados de bactérias do ácido láctico em soro de leite e potencial aplicação industrial**. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de São João Del Rei. Divinópolis, Minas Gerais, p. 153. 2021.

COUGHLIN, J. R.; NICKERSON, T. A. Acid-catalyzed hydrolysis of lactose in whey and aqueous solutions. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 2, p. 169-174, 1974.

COTÉ, A.; BROWN, W.A.; CAMERON, D.; WALSUM, G.P. van. Hydrolysis of lactose in whey permeate for subsequent fermentation to ethanol. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.6, p.1608-1620, 2004. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73315-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73315-9).

CZYZEWSKA, K.; TRUSEK, A. Encapsulated NOLA™ Fit 5500 lactase—an economically beneficial way to obtain lactose-free milk at low temperature. **Catalysts** v. 11, p.527, 2021. <https://doi.org/10.3390/catal11050527>

DEBIAGI, F.; MADEIRA, T.B., NIXDORF, S.L., MALI, S. Pretreatment efficiency using autoclave high-pressure steam and ultrasonication in sugar production from liquid hydrolysates and access to the residual solid fractions of wheat bran and oat hulls. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.190, p. 166-181, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03092-0>.

DEKKER, P.; KOENDERS, D.; BRUINS, M. Lactose-Free Dairy Products: Market Developments, Production, Nutrition and Health Benefits. **Nutrients**, v.11, n.3, p.551, 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11030551>.

DUA, S.; KUMAR, S.; KAUR, S.; GANAI, A.W.; KHURSHEED, I. Chemical and sensory attributes of ghee residue burfi supplemented with corn flour. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.7, n.2, p.3818-3822, 2018.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. I. Colorimetric Method for Determination of sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

EXPERT MARKET SHARE. Global Ghee Market. Disponível em: <<https://www.expertmarketresearch.com/reports/ghee-market>>. Acesso em 16 de novembro de 2022.

FAN, F.; ROSS, Y.H. X-ray diffraction analysis of lactose crystallization in freeze-dried lactose-whey protein systems, **Food Research International**, v.67, p. 1-11, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.023>.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, 2002.

FOX, P. F.; UNIACKE-LOWE, T.; McSWEENEY, P.L.H.; O'MAHONY, J.A. Lactose. In: Fox, P. F.; UNIACKE-LOWE, T.; McSWEENEY, P.L.H.; O'MAHONY, J.A. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Springer International Publishing, 2015, p. 21–68. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2_2).

GAGIĆ, T.; PERVA-UZUNALIĆ, A.; KNEZ, Ž.; ŠKERGET, M. Hydrothermal treatment of sugars to obtain high-value products. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 85, n. 1, p. 97-109, 2020. <https://doi.org/10.2298/JSC181218070G>

GAJENDRAGADKAR, C.N.; GOGATE, P.R. Ultrasound assisted acid catalyzed lactose hydrolysis: Understanding into effect of operating parameters and scale up studies. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.37, p.9-15, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.029>.

GÄNZLE, M.G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v.18, n.7, p.685-694, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.003>.

GHECKI, A.T.; NASCIMENTO, O.M.; FERREIRA, D.W.F.; NETA, I.B.P.; SILVA, L.L.; COUTINHO, R.M.P.; SEIXA, V.N.C. **Técnicas analíticas para controle de qualidade de leites e derivados**. 22. ed. Belém: EDUEPA, 2018. 165p. ISBN 978 85 8458 027 9.

GILLE, D.; WALTHER, B.; BADERTSCHER, R.; BOSSHART, A.; BRÜGGER, C.; BRÜHLHART, M.; GAUCH, R.; NOTH, P.; VERGÈRES, G.; EGGER, L. Detection of

lactose in products with low lactose content. **International Dairy Journal**, v.83, p. 17-19, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.03.003>.

GRENOV, B.; BRIEND, A.; SANGILD, P.T.; THYMANN, T.; RYTTER, M.H.; HOTHER, A.L. MØLGAARD, C.; MICHAELSEN, K.F. Undernourished children and milk lactose. **Food and Nutrition Bolletin**, v.37, n.1, p.85-99, 2016. <https://doi.org/10.1177/0379572116629024>.

GUEVARA-ALVARADO, H. M.; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N.; CARRILLO-PÉREZ, E.; VARGAS-BELLO-PÉREZ, E.; RODRÍGUEZ-FIGUEROA, J.C. Value-added compounds with health benefits produced from cheese whey lactose. *In*: GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N. **Lactose and Lactose Derivatives**, IntechOpen, 2020, p. 1-18. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94197>.

GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N. Introductory Chapter: Lactose. *In*: GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N. **Lactose and Lactose Derivatives**, IntechOpen, 2020, p. 1-5. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93837>.

HARJU, M.; KALLIOIENEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose Hydrolysis and Other Conversions in Dairy Products: Technological Aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 104-109, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.09.011>.

HAYEK, S. A.; IBRAHIM, S. A. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. **Food Nutrition Science**. v. 4, n. 1, p. 73- 87, 2013. [10.4236/fns.2013.411A010](https://doi.org/10.4236/fns.2013.411A010).

HÉBERT, E.M.; RAYA, R.R.; GIORI, G. S. Evaluation of minimal nutritional requirements of lactic acid bacteria used in functional foods. *In* Walker JM, Spencer JFT and Ragout de Spencer AL (eds), **Environmental Microbiology**. Springer, p. 139–148, 2004

HANAFI, H.N.A.; KAMARUDING, N.A., SHAHARUDDIN, S. Influence of coconut residue dietary fiber on physicochemical, probiotic (*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014) survivability and sensory attributes of probiotic ice cream. **LWT – Food Science and technology**, v.154, p.112725, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112725>

HIRPARA, P.; PRAJAPATI, J.P.; MEHTA, B.M.; PINTO, S.V. Development of Thabdi milk sweets of Gujarat State, India utilizing Ghee residue as an ingredient. **Journal of Applied an Natural Science**, v.12, n.4, p.575-581, 2020. <https://doi.org/10.31018/jans.v12i4.2414>

HORNER, T.W.; DUNM, M.L.; EGGETT, D.L.; OGDEN L.B.  $\beta$ -galactosidase activity of commercial lactase samples in raw and pasteurized milk at refrigerated temperatures. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3242-3349, 2011. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3742>.

ILANGO, S.; ANTONY, U. Probiotic microorganisms from non-dairy traditional fermented foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.113, p. 617-638, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.034>.

IMARC GROUP. Imarc: Global Ghee Market to Reach US\$ 73.5 Billion by 2028, Impelled by Surging Awareness About its Associated Health Benefits, dez., 2022. Disponível em: <<https://www.imarcgroup.com/global-ghee-market>>. Acesso em 01 de fevereiro de 2023.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008. p.1020.

JANGHU, S.; KAUSHIK, R.; BANSAL, V.; SHARMA, P.; DHINDWAL, S. Physico-Chemical analysis of ghee residue and conversion into confectionary food products. **Indian Journal Dairy Science**, v.67, n.4, p.1-6, 2014. <https://doi.org/10.5146/ijds.v67i4.34943>.

KANASAKI, M.; BREHENY, S.; HILLIER, A.J.; JAGO, G.R. Effect of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.30, n.4, p. 142A, 143-144, 1975.

KATOCH, G.K.; NAIN, N.; KAUR, S.; RASANE, P. Lactose intolerance and its dietary management an update. **Journal of the American College of Nutrition**, v.1, n.1, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1080/07315724.2021.1891587>.

KYE, Y.J.; LEE, S.Y.; KIM, H.R.; LEE, B.H.; PARK, J.; PARK, M.S.; JI, G.E.; SUNG, M.K. *Lactobacillus acidophilus* PIN7 paraprobiotic supplementation ameliorates DSS-induced colitis through anti-inflammatory and immune regulatory effects. **Journal of Applied Microbiology**, v.132, p. 3189– 3200, 2022. <https://doi.org/10.1111/jam.15406>.

KIRK, J.H.; DANN, S.E.; BLATCHFORD, C.G. Lactose: A definitive guide to polymorph determination. *International Journal of Pharmaceutics*, v.334, n.1-2, p.103-114, 2007. <https://doi.org/10.16/j.ijpharm.2006.10.026>.

KUMAR, M.; PANDYA, H.B.; DODIYA, K.K.; BHATT, R.; MANGUKIYA, M. Advancement in industrial method of ghee making process at sarvottam dairy, bhavnagar, gujarat (India). **International Journal os Science, Enviroment and Technology**, v.6, n.3, p.1727-1736, 2017. ISSN 2278-3687.

LAMSAL, B.; BHANDARI, T.R.; PANTA, P.; SAITER, J.M.; POKHREL, S.; KATAWAL, T.B.; ADHIKARI, R. Preparation and physicochemical characterization of ghee and murcchita ghrta. *Journal of ayurveda and integrative medicine*, v. 11, n. 1, p. 256-260, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2020.06.004>.

LARA-MOTA, E.E.; SALAS, C.A.; LEYVA-PORRAS, C.; SAAVEDRA-LEOS, M.Z. Cutting-edge advances on the stability and state diagram of pure  $\beta$ -lactose. **Materials Chemistry and Physics**, v.289, p. 1-8, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.126477>.

LEI, Y.; ZHOU, Q.; ZHANG, Y.L.; CHEN, J.B.; SUN, S.Q.; NODA, I. Analysis of crystallized lactose in milk poder by Fourier-transform infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation infrared spectroscopy. **Journal of**

**Molecular Structure**, v. 974, p. 88-93, 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2009.12.030>.

LIN, A.Y.; NICKERSON, A. Acid hydrolysis of lactose in whey versus aqueous solutions. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 1, p. 34-39, 1976.

LINDSAY, M. J.; WALKER, T.W.; DUMESIC, J.A.; RANKIN, S.A.; HUBER, G.W. Production of Monosaccharides and Whey Protein from Acid Whey Waste Streams in the Dairy Industry. **Green Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 1824–34, 2018.  
<https://doi.org/10.1039/C8GC00517F>.

LISTIOHADI, Y.; HOURIGAN, J.A.; SLEIGH, R.W.; STEELE, R.J. Thermal analysis of amorphous lactose and  $\alpha$ -lactose monohydrate. **Dairy Science & Technology**, v. 89, n. 1, p. 43-67, 2009. 10.1051/dst:2008027.

LOGANATHAN, R.; SHAMSUDEEN, P.; MANI, K., EDWIN, S.C.; RAJENDRAN K. Utilization of ghee residue in the diet of broiler chicken. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v.15, n.1, p. 121 – 128, 2015. <https://doi.org/10.5958/0974-181X.2015.00013.X>

LÓPEZ-PABLOS, A.L.; LEYVA-PORRAS, C.C.; SILVA-CÁZARES, M.B.; LONGORIA-RODRÍGUEZ, F.E.; PÉREZ-GARCÍA, S.A.; VÉRTIZ-HERNÁNDEZ, Á.A.; SAAVEDRA-LEOS, M.Z. Preparation and characterization of high purity anhydrous  $\beta$ -lactose from  $\alpha$ -lactose monohydrate at mild temperature. **International Journal of Polymer Science**, v. 2018, id. 5069063, p.1-10, 2018.  
<https://doi.org/10.1155/2018/5069063>.

LUNARDI, J.V.D.; FERREIRA, C.C.; CAVALI, J.; VAIS, J.O.; DIAS, A.A.; GASPAROTTO, P.H.G. Non starter lactic acid bacteria (NSLAB): A challenge to the cheese industry. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.3, p.26383-26409, 2021.  
<https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-372>.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 14.ed., Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli, **Journal of Applied Bacteriology**, v.23, n.1, p. 130-135, 1960.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>

MARDONES, L.; VILLAGRÁN, M. Lactose Synthesis. *In*: GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N. **Lactose and Lactose Derivatives**. IntechOpen, 2020, p. 1-12.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.91399>.

MENG, L.; LI, S.; LIU, G.; FAN, X.; QIAO, Y.; ZHANG, A. LIN, Y.; ZHAO, X.; HUANG, K.; FENG, Z. The nutrient requirements of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and their application to fermented milk. **Journal Dairy Science**, v. 104, n.1, p. 138-150.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-18953>.

MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426 – 428, 1959.

MISSELWITZ, B.; POHL, D.; FRÜHAUF, H.; FRIED, M.; VAVRICKA, S.R.; FOX, M. Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. **United European Gastroenterology Journal**, v.1, n.3, p. 151-159, 2013. <https://doi.org/10.1177/2050640613484463>.

MUNIRATHNAMMA, V.; GUPTA, V.K.; MEENA, G.S. Process optimization for the production of ghee residue protein hydrolysates. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.87, n.4, p.490-494, 2017.

NOMI, Y.; SATO, T.; MORI, Y.; MATSUMOTO, H. Evaluation of fructo-, inulin-, and galacto-oligosaccharides on the maillard reaction products in model systems with whey protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, p. 9154-9165, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c03197>.

ORDÍÑEZ, J.A.P.; RODRÍGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L.H.; CORTECERO, M.D.S. **Tecnología de Alimentos: Alimentos de origem animal**. 2. vol. Porto Alegre: Artmed, 2005. 149 p. ISBN 85-363-0431-6.

PATEL, A.; SARTAJ, K.; PRUTHI, V.; MATSAKAS, L. Utilization of Clarified Butter Sediment Waste as a Feedstock for Cost-Effective Production of Biodiesel. **Foods**, v.8, n.7, p. 234, 2019. <https://doi.org/10.3390/foods8070234>.

PATEL, S. R.; MURTHY, Z. V. P. Optimization of process parameters by Taguchi method in the recovery of lactose from whey using sonocrystallization. **Crystal Research & Technology**, v. 45, n.7, p.747-752, 2010. <https://doi.org/10.1002/crat.201000139>.

PENA-SERNA, C. RESTREPO-BETANCUR, L. F. Chemical, physicochemical, microbiological and sensory characterization of cow and buffalo ghee. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 444-450, 2020. <https://doi.org/10.1590/fst.32219>.

PERRONE, T. I.; SILVEIRA, A.C.P.; MARTINS, E. CARVALHO, A. F.; SCHUCK, PIERRE. Lactose. In: Cruz, A.G.; ZACACHENCO, P.B.; OLIVEIRA, C.A.F.; CORASSIN, C.H. **Química, Bioquímica, Análise Sensorial e Nutrição no Processamento de Leite e Derivados**: Coleção Lácteos. Elsevier Brasil, 2017.

PEREIRA, M. C. S.; BRUMANO, L.P.; KAMIYAMA, C.M.; PEREIRA, J.P.F.; RODARTE, M.P.; PINTO, M.A.O. Lácteos com baixo teor de lactose: Uma necessidade para portadores da má digestão da lactose e um nicho de mercado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 389, p. 57 – 65, 2012. [10.5935/2238-6416.20120079](https://doi.org/10.5935/2238-6416.20120079).

POOPATHI, S.; ABIBIDHA, S. The use of clarified butter sediment waste from dairy industries for the production of mosquitocidal bacteria. **International Journal of Dairy Technology**, v.65, p.152–157, 2012.

QUEIROZ, E.S.; REZENDE, A.L.L.; PERRONE, I.T.; FRANCISQUINI, J.A.; CARVALHO, A.F.; ALVES, N.M.G.; OLIVEIRA, L.F.C.; STEPHANI, R. Spray drying

and characterization of lactose-free goat milk. **LWT – Food Science and Technology**, v. 147, p. 1-9, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111516>.

RAY, P. R. Technological and Biochemical Aspects of Ghee (Butter Oil). *In*: RAY, P. R. **Engineering Practices for Milk Products**. Series statement: Innovations in agricultural and biological engineering: Apple Academic Press, 2019. p. 83-109. ISBN 9780429264559.

ROCHA, J. M.; GUERRA, A. On the valorization of lactose and its derivatives from cheese whey as a dairy industry by-product: an overview. **European Food Research and Technology**, v.246, p.2161-2174, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03580-2>.

SAHASRABUDHE, J.; PALSHIKAR, S.; GOJA, A.; KULKARNI, C. Use of Ghee Residue as a Substrate for Microbial Lipase Production. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v.1, n.10, p.1-4, 2012.

SAQIB, S.; AKRAM, A.; HALIM, S.A.; TASSADUQ, R. Sources of  $\beta$ -Galactosidase and Its Applications in Food Industry. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 79 - 85, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0645-5>

SCHULZ, P.; RIZVI, S. S. H. Hydrolysis of Lactose in Milk: Current Status and Future Products. **Food Reviews International**, p. 1–20, 2021. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1983590>.

SELINA WAMUCCI. **Export market prices for US lactose**. Disponível em: <<https://www.selinawamucii.com/insights/prices/united-states-of-america/lactose/>>. Acesso em 28 de janeiro de 2023.

SELLE, K.M.; KLAENHAMMER, T.R. **Lactobacillus acidophilus**. *IN*: BATT, C. A; TORTORELLO, M. Encyclopedia of Food Microbiology. 2. ed. Londres: Elsevier. 2014, p. 412- 417.

SHIMANOUCI, T.; MANO, R.; YOSHIOKA, Y.; FUKUDA, A.; PARK, K.M.; KIMURA, Y. Kinetic pH Titration to Predict the Acid and Hydrothermal Conditions for the Hydrolysis of Disaccharides: Use of a Microcapillary System. **Hindawi Journal of Chemistry**, v.4, p.1-9, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3985915>

SIGMA-ALDRICH. Glucose (GO) Assay KIT. Product Information. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/516/298/gago20bul.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2021.

SIGMA-ALDRICH. Lactose (MAK017) Assay KIT. Product Information. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/324/674/mak017bul.pdf>. Acesso em: 26 jun de 2022.

SURI, S.; KUMAR, V.; PRASAD, R.; TANWAR, B.; GOYAL, A.; KAUR, S.; GAT, Y.; KUMAR, A.; KAUR, J.; SINGH, D. Considerations for development of lactose-free

food. **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**, v.15, p. 27-34, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jnim.2018.11.003>.

TEAME, T.; WANG, A.; XIE, M.; ZHANG, Z.; YANG, Y.; DING, Q.; GAO, C.; OLSEN, R.E.; RAN, C.; ZHOU, Z. Paraprobiotics and postbiotics of probiotic lactobacilli, their positive effects on the host and action mechanisms: a review. **Frontiers in Nutrition**, v.7, p.570344, 2020. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.570344>.

TOBA, T.; YOKOTA, A.; ADACHI, S. Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -Galactosidase. **Food Chemistry**, v.16, n.1, p.147-162, 1984.

TOLEDO, P.H.M.; PEREIRA, J.P.F.; PERRONE, I.T.; CARVALHO, A.F.; OLIVEIRA, L.F.C.; STEPHANI, R. Caracterização da superfície de partículas de produtos lácteos desidratados. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.75, n.1, p. 10-15, 2020. [10.14295/2238-6416.v75il.755](https://doi.org/10.14295/2238-6416.v75il.755).

TRINDADE, D.P.A.; BARBOSA, J.P.; MARTINS, E.M.F.; TETTE, P.A.S. Isolation and identification of lactic acid bacteria in fruit processing residues from the Brazilian Cerrado and its probiotic potential. **Food Bioscience**, v.48, p. 1-11, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101739>.

VUJICIC, I.F.; LIN, A.Y.; NICKERSON, T.A. Changes during acid hydrolysis of lactose. **Journal of Dairy Science**, v.60, n. 29, 1976.

WANI, A.D.; PRASAD, W.; KHAMRUI, K.; JAMB, S. A review on quality attributes and utilization of ghee residue, an under-utilized dairy by-product. **Future Foods**, v.5, n.100131, p. 1-18, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100131>.

WIJAYASINGHE, R.; BOGAHAWATHTHA, D.; CHANDRAPALA, J. VASILJEVIC, T. Crystallization behavior and crystal properties of lactose as affected by lactic, citric, or phosphoric acid, **American Dairy Science Association**, v.103, p. 11050-11061, 2020. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18375>.

XIAO, Y.; CHEN, Q.; GUANG, C.; ZHANG, W.; MU, W. An Overview on Biological Production of Functional Lactose Derivatives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 9, p. 3683 – 3691, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09755-6>.

XU, X.; CUI, H.; XU, J.; YUAN, Z.; LIU, X.; FAN, X.; LI, J.; ZHU, D.; LIU, H. Effects of different probiotic fermentations on the quality, soy isoflavone and equol content of soy protein yogurt made from soy whey and soy embryo powder. **LWT- Food Science and Technology**, v.157, p. 1-10, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113096>.

YAMAUCHI, S.; HATAKEYAMA, S.; IMAI, Y.; TONOUCI, M. Nondestructive evaluation of crystallized-particle size in lactose-powder by terahertz time-domain spectroscopy. **Optical Engineering**, v. 53, n. 3, p. 031203-1 – 031203-4, 2014. [10.1117/1.OE.53.3.03120](https://doi.org/10.1117/1.OE.53.3.03120)

ZHENG, X.M.; MARTIN, G.P.; MARRIOTT, C.; PRITCHARD, J. The influence of crystallization conditions on the morphology of lactose intended for use as a carrier for dry powder aerosol. **Journal Pharm. Pharmacol**, v.52, n.1, p. 633-643, 2000.

## ANEXOS

## ANEXO I – PEDIDO DE DEPÓSITO DE PATENTE



27/07/2022 870220066333

17:22



29409161952665441

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2022 014890 2

**Dados do Depositante (71)**

---

**Depositante 1 de 1****Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 78640489000153**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS UNIVERSITARIO**Cidade:** Londrina**Estado:** PR**CEP:** 86055-900**País:** Brasil**Telefone:** (043) 3371 5812**Fax:** (043) 3371 5812**Email:** aintecpi@uel.br