

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

Graziela De Carli

**Concentrado proteico de soro de leite: aplicação em biscoitos tipo cookie e
avaliação do seu efeito na remodelação óssea**

Passo Fundo

2016

Graziela De Carli

**Concentrado proteico de soro de leite: aplicação em biscoitos tipo cookie e
avaliação do seu efeito na remodelação óssea**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, sob orientação da professora Dra. Telma Elita Bertolin e co-orientação do professor Dr. Luiz Carlos Gutkoski

Passo Fundo

2016

CIP – Catalogação na Publicação

- C282c Carli, Graziela de
Concentrado proteico de soro de leite : aplicação em biscoitos tipo cookie e avaliação do seu efeito na remodelação óssea / Graziela de Carli. – 2016.
[171] p. : il., color. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2016.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Telma Elita Bertolin.
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Gutkoski.
1. Ossos – Formação. 2. Soro do leite. 3. Proteínas – Análise. 4. Ossos – Reabsorção. 5. Alimentos – Análise. I. Bertolin, Telma Elita, orientadora. II. Gutkoski, Luiz Carlos, coorientador. II. Título.

Dedicatória

Aos meus filhos Isabela e Nicolas, meu esposo Marcelo e meus pais Orides e Marilene, pelo valioso amor e pela presença constante em minha vida. Meus agradecimentos por terem compreendido a minha ausência por longas horas durante este tempo de estudo.

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que contribuíram para a concretização de mais um objetivo de minha vida, meu sincero agradecimento, em especial:

À Universidade de Passo Fundo, por todas as oportunidades que me foram concedidas durante os períodos de graduação e pós-graduação e por todos os conhecimentos adquiridos durante esses anos de estudos e trabalho na universidade.

À querida professora Dra. Telma Elita Bertolin, pessoa amiga, por sua orientação e presteza durante todo o período de pós-graduação. Agradeço muito pela amizade, carinho e apoio, que foram muito importantes para a concretização deste trabalho.

Ao querido professor Dr. Luiz Carlos Gutkoski, pessoa admirável, que sempre ajudou nos momentos difíceis, incentivando para que este trabalho se concretizasse.

Às amigas e colegas de trabalho Ana Luisa, Valeria e Nair, pelo incentivo a prestar a seleção do mestrado, pela amizade e apoio durante estes dois anos.

Aos funcionários e estagiários dos Laboratórios do Centro de Pesquisa em Alimentos da UPF, por toda a ajuda durante o desenvolvimento desse trabalho.

Às pessoas participantes do estudo clínico e dos testes de análise sensorial, pela participação e interesse.

Às alunas Ana Carolina e Jordana, pela disponibilidade de ajudar no desenvolvimento deste trabalho.

Aos queridos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelas aulas e oportunidade de aquisição de novos conhecimentos.

À amiga Tatiana, pelo apoio e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas e amigos de sala de aula.

À amiga Taís, pela ajuda durante o desenvolvimento dos biscoitos.

À amiga Caroline, pela concessão da indústria na produção dos biscoitos para o estudo clínico.

À Empresa Sooro, pelo fornecimento do concentrado proteico de soro de leite.

A todos acima e aqueles que não mencionei, mas que contribuíram para a realização deste trabalho, os meus profundos agradecimentos. Muito obrigada!

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
volta ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

Este trabalho objetivou a utilização de concentrado proteico de soro de leite (CPS) para a formulação de um biscoito tipo cookie, a avaliação de suas características tecnológicas e sensoriais e seu efeito na formação e reabsorção óssea de mulheres adultas. As etapas metodológicas incluíram a formulação dos biscoitos com diferentes proporções de concentrado proteico do soro de leite e aveia, sua caracterização física, química, nutricional e sensorial e um estudo clínico, avaliando formação e reabsorção óssea de mulheres adultas. A análise do efeito combinado das variáveis individuais (CPS e aveia) sobre as características tecnológicas dos biscoitos foi realizada utilizando-se um delineamento experimental composto rotacional, envolvendo duas variáveis independentes (CPS e aveia). Foram realizados 11 ensaios, sendo quatro fatoriais, quatro axiais e três repetições no ponto central. Para os testes sensoriais e análises nutricionais, foram selecionadas as três melhores formulações segundo análise tecnológica e composição centesimal. A formulação com melhor resultado nos testes sensoriais foi a selecionada para o estudo clínico, realizado por 16 dias, onde as participantes ingeriram quatro biscoitos ao dia neste período. Análises de sangue e urina foram realizadas antes e após a ingestão dos biscoitos para verificar diferenças após a introdução dos biscoitos. Os marcadores bioquímicos osteocalcina e telopeptídeos aminoterminais do colágeno tipo I (NTX) foram utilizados para avaliar formação e reabsorção óssea, respectivamente. Os resultados das análises físico-químicas nos biscoitos tipo cookies, mostraram que os biscoitos dos ensaios 2 e o do ponto central apresentam as melhores características tecnológicas, com bons resultados no fator de expansão, cor e textura. Já para a composição química, a formulação 8 foi o que apresentou maior ganho nutricional devido ao alto teor de proteínas. Dessa forma, as formulações selecionadas para as análises nutricionais e a sensorial foram as formulações 2, 8 e o ponto central. Nos testes sensoriais, a formulação com maior aceitabilidade, preferência e intenção de compra foi a formulação com 15% de CPS e 20% de aveia (ponto central), sendo esta a selecionada para o estudo clínico. Os resultados das análises de minerais, aminoácidos e digestibilidade corrigida pelo escore de aminoácidos mostraram que a formulação com 15% de CPS e 20% de aveia é um produto com elevado valor nutricional. Participaram do estudo clínico, quinze mulheres com média de idade de $24,8 \pm 6,4$ anos. Verificou-se que os níveis de cálcio no sangue e na urina ficaram inalterados após os 16 dias de ingestão do biscoito. A concentração de osteocalcina no sangue aumentou significativamente após os 16 dias de ingestão, enquanto a excreção urinária de NTX tendeu a diminuir após os 16 dias, apesar da diferença não ser significativa. Não foi encontrada correlação entre NTX e osteocalcina antes da ingestão do biscoito, mas depois dos 16 dias de ingestão do biscoito contendo CPS e aveia encontrou-se correlação, com coeficiente de 0,7902 ($p < 0,001$). Conclui-se que o biscoito tipo cookie contendo 15% de CPS e 20% aveia foi o que apresentou as melhores características tecnológicas e sensoriais, e que o mesmo possui um elevado valor nutricional. Sugere-se que a inclusão do biscoito na dieta das mulheres traz benefícios ao metabolismo ósseo, em especial a formação óssea.

Palavras-chave: Atributos sensoriais. Formação óssea. Proteínas do soro de leite. Reabsorção óssea.

ABSTRACT

This study aimed to use protein concentrate whey (CPS) for the formulation of a biscuit type cookie, the evaluation of its technological and sensory characteristics and its effect on bone formation and resorption of adult women. The methodological steps included the formulation of biscuits with different protein concentrate proportions of milk and oat serum, physical, chemical, nutritional and sensory characteristics and a clinical study evaluating bone formation and resorption of adult women. Analysis of the combined effect of individual variables (CPS and oats) on the technological characteristics of cookies was performed using an experimental design comprised rotational involving two independent variables (CPS and oats). 11 trials were performed, four factorial, four axial and three central points. For sensory tests and nutritional analysis, the three best formulations second technological analysis and chemical composition selected. The formulation with better results in the sensory test was selected for the clinical study, carried out for 16 days, where participants consumed four cookies a day in this period. Blood and urine samples were taken before and after ingestion of cookies to verify differences after the introduction of cookies. Biochemical markers osteocalcin and aminoterminals telopeptides of type I collagen (NTX) were used to assess bone formation and resorption, respectively. The results of physicochemical analyzes biscuits type cookies, biscuits showed that the tests 2 and the central point have the best technological characteristics, with good results in the expansion factor, color and texture. As for the chemical composition, formulation 8 showed the highest nutritional gain due to the high protein content. Thus, the formulations selected for the nutritional and sensory analysis were the formulations 2, 8 and the center point. In sensory tests, the formulation with greater acceptability, preference and purchase intent was the formulation with 15% of CPS and 20% oats (center point), which is selected for the clinical study. The results of the analysis of minerals, amino acids and the digestibility corrected amino acid score showed that the formulation with 15% PSC and 20% oat is a product with high nutritional value. Participated in the clinical study, fifteen women with a mean age of 24.8 ± 6.4 years. It was found that calcium levels in the blood and urine were unchanged after 16 days of ingestion of the cookie. The concentration of osteocalcin in blood rose significantly after 16 days of intake, while urinary excretion of NTX tended to decline after 16 days although the difference was not significant. No correlation was found between osteocalcin and NTX before the cookie intake, but after 16 days of taking the biscuit containing CPS and oats was found correlation, with a coefficient of 0.7902 ($p < 0.001$). It is concluded that the biscuit type cookie containing 15% of CPS and 20% oat showed the best technological and sensory characteristics, and that it has a high nutritional value. It is suggested that the inclusion of biscuit on women's diet is beneficial to bone metabolism, especially bone formation.

Keywords: Sensory attributes. Bone formation. Proteins from the whey. Bone resorption.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Produção total de queijos no Brasil (em mil toneladas).....	31
Figura 2. Consumo per capita de queijos no Brasil (em quilos).....	32
Figura 3. Gráfico representativo da análise do perfil de textura.	42
Figura 4. Representação do analisador de textura em amostra de biscoito.....	43
Figura 5. Representação dos parâmetros de cor de acordo com o sistema CIELab.	45
Figura 6. Ciclo de remodelação óssea.....	50
Figura 7. Alterações da massa óssea ao longo da vida.	51
Figura 8. Fluxograma das atividades experimentais.....	57
Figura 9. Biscoitos embalados e identificados para consumo. Passo Fundo/RS, 2016.	67
Figura 10. Biscoitos das formulações 1, 2, 3 e 4.	71
Figura 11. Biscoitos das formulações 5, 6, 7 e 8.	71
Figura 12. Biscoitos das formulações do ponto central.	71
Figura 13. Superfície de reposta para perda de peso (g) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%).	74
Figura 14. Superfície de reposta para o fator de expansão (g) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%).	76
Figura 15. Superfície de reposta para luminosidade (L*) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%)	83
Figura 16. Superfície de reposta para a coordenada a* nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%)	83
Figura 17. Superfície de reposta para a coordenada b* nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%)	84
Figura 18. Superfície de reposta para dureza (g) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%).	87
Figura 19. Superfície de reposta para fraturabilidade (mm) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%)	88
Figura 20. Superfície de reposta para proteínas (%) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%)	94
Figura 21. Superfície de reposta para cinzas (%) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%).	94

Figura 22. Superfície de reposta para carboidratos (%) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%)	95
Figura 23. Superfície de reposta para fibras (%) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%).....	95
Figura 24. Alterações individuais nas concentrações de osteocalcina e NTX antes e depois dos 16 dias de ingestão dos biscoitos enriquecidos com CPS e aveia.	113
Figura 25. Relação entre excreção urinária de NTX e concentração de osteocalcina no sangue antes e depois da ingestão do biscoito enriquecido com CPS e aveia.	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Volume de leite cru adquirido pelos laticínios no 1º trimestre de 2015 no Brasil. ...	31
Tabela 2. Exemplos de propriedades tecnológicas e funcionais conferidas a alimentos por concentrados proteicos de soro de leite.....	34
Tabela 3. Composição média de aminoácidos por grama de proteína.....	37
Tabela 4. Marcadores bioquímicos de remodelação óssea.	53
Tabela 5. Variáveis e níveis do delineamento experimental.	58
Tabela 6. Delineamento experimental composto rotacional para duas variáveis e dois níveis.	59
Tabela 7. Formulação padrão dos biscoitos tipo cookie.	60
Tabela 8. Formulação adaptada com adição de CPS e flocos de aveia.	60
Tabela 9. Respostas da avaliação tecnológica de biscoitos utilizando planejamento fatorial 2 ² para perda de peso, diâmetro, espessura, fator de expansão e volume específico.....	72
Tabela 10. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) na perda de peso dos biscoitos (g), ao nível de 95% de confiança	73
Tabela 11. Análise de variância para perda de peso dos biscoitos	74
Tabela 12. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) no fator de expansão dos biscoitos (g), ao nível de 95% de confiança	75
Tabela 13. Análise de variância para fator de expansão dos biscoitos	76
Tabela 14. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) no volume específico (mL.g ⁻¹), ao nível de 95% de confiança	77
Tabela 15. Análise de variância para volume específico nas formulações de biscoito	77
Tabela 16. Respostas da avaliação tecnológica de biscoitos usando planejamento fatorial 2 ² para os parâmetros de cor (L*, a* e b*).....	78
Tabela 17. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para luminosidade (L*), ao nível de 95% de confiança.....	79
Tabela 18. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para a coordenada a*, ao nível de 95% de confiança	79
Tabela 19. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para a coordenada b*, ao nível de 95% de confiança	79
Tabela 20. Análise de variância para a cor dos biscoitos.....	82

Tabela 21. Respostas da avaliação tecnológica de biscoitos usando planejamento fatorial 2 ² para dureza e fraturabilidade.....	85
Tabela 22. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para dureza (g), ao nível de 95% de confiança	85
Tabela 23. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para fraturabilidade (mm), ao nível de 95% de confiança	86
Tabela 24. Análise de variância para dureza dos biscoitos	87
Tabela 25. Análise de variância para fraturabilidade dos biscoitos.....	87
Tabela 26. Composição química dos biscoitos elaborados com diferentes concentrações de CPS e flocos de aveia.....	89
Tabela 27. Estimativa dos efeitos da adição de flocos de aveia (%) e adição de CPS (%) no teor de umidade dos biscoitos (%).....	89
Tabela 28. Análise de variância para o teor de umidade nas formulações dos biscoitos.....	90
Tabela 29. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) na composição química dos biscoitos (%), ao nível de 95% de confiança.....	91
Tabela 30. Análise de variância para a composição química dos biscoitos	93
Tabela 31. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para o valor calórico total (kcal.100g ⁻¹), ao nível de 95% de confiança	96
Tabela 32. Perfil descritivo de consumidores participantes dos testes de análise sensorial, Passo Fundo/RS, 2016	97
Tabela 33. Frequência de consumo (%) de biscoitos por consumidores participantes dos testes sensoriais, Passo Fundo/RS, 2016	98
Tabela 34. Distribuição de notas (%) de acordo com a preferência de consumidores (n = 65) na análise sensorial de biscoitos enriquecidos com CPS e aveia, Passo Fundo/RS, 2016	99
Tabela 35. Resultados do teste de aceitação de biscoitos enriquecidos com concentrado proteico de soro de leite e aveia. Passo Fundo/RS, 2016	99
Tabela 36. Resultado do teste de intenção de compra para formulações de biscoito contendo CPS e aveia.....	100
Tabela 37. Minerais em miligramas por 100 gramas dos biscoitos segundo formulações	101
Tabela 38. Ácidos graxos saturados e insaturados em gramas por 100 gramas dos biscoitos segundo formulações.....	103
Tabela 39. Composição de aminoácidos e escore químico da formulação de biscoito ponto central.....	105
Tabela 40. Digestibilidade proteico <i>in vitro</i> das formulações selecionadas	106

Tabela 41. Digestibilidade da proteína corrigida pelo escore de aminoácidos (PDCAAS) para a formulação ponto central.....	108
Tabela 42. Características socioeconômicas e demográficas das mulheres participantes do estudo clínico, Passo Fundo/RS, 2016.....	109
Tabela 43. Características de consumo de biscoitos das mulheres participantes do estudo clínico, Passo Fundo/RS, 2016.....	109
Tabela 44. Ingestão média de energia (kcal/dia), proteína (g/dia), lipídios (g/dia), carboidratos (g/dia) e cálcio (mg/dia) pelas mulheres participantes do estudo, Passo Fundo/RS, 2016....	110
Tabela 45. Influência da introdução do biscoito enriquecido com concentrado proteico de soro de leite e aveia na dieta no estado nutricional e composição corporal das participantes do estudo, Passo Fundo/RS, 2016.....	111
Tabela 46. Níveis de cálcio no sangue e na urina das participantes do estudo, Passo Fundo, 2016.....	113
Tabela 47. Indicadores bioquímicos de remodelação óssea das mulheres participantes do estudo, antes e depois da ingestão do biscoito contendo CPS e aveia, Passo Fundo/RS, 2016.....	113

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1	SORO DE LEITE	29
2.1.1	Aspectos econômicos da produção de soro de leite	30
2.2	CONCENTRADOS PROTEICOS DE SORO DE LEITE	32
2.3	PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE E SAÚDE	35
2.4	AVEIA.....	40
2.4.1	Propriedades físicas e tecnológicas das fibras	41
2.5	TEXTURA	42
2.6	COR	44
2.7	ANÁLISE SENSORIAL.....	46
2.8	DIGESTIBILIDADE CORRIGIDA PELO ESCORE DE AMINOÁCIDOS..	48
2.9	REMODELAÇÃO ÓSSEA	49
2.10	MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELAÇÃO ÓSSEA.....	51
2.10.1	Osteocalcina	53
2.10.2	Telopectídeos aminoterminais do colágeno tipo I	55
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.1	CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE (CPS).....	58
3.2	APLICAÇÃO DO CPS EM BISCOITOS TIPO COOKIES	58
3.2.1	Delineamento experimental	58
3.2.2	Formulação dos biscoitos tipo cookie	59
3.2.3	Análises físico-químicas	61
3.2.4	Análise nutricional dos biscoitos.....	62
3.2.5	Análise sensorial.....	64
3.3	ESTUDO CLÍNICO	65
3.3.1	Inclusão do biscoito na dieta	66
3.3.2	Composição corporal.....	67
3.3.3	Antropometria e estado nutricional	68
3.3.4	Ingestão alimentar	68
3.3.5	Análise da formação óssea.....	69

3.3.6	Análise da reabsorção óssea.....	69
3.3.7	Doseamento de cálcio	69
3.4	TRATAMENTO DOS DADOS.....	70
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1	BISCOITO TIPO COOKIE.....	71
4.1.1	Desenvolvimento dos biscoitos tipo cookie.....	71
4.1.2	Avaliação tecnológica dos biscoitos.....	72
4.1.3	Análise sensorial.....	97
4.1.4	Análises nutricionais.....	100
4.2	ESTUDO CLÍNICO	108
4.2.1	Caracterização do grupo	108
4.2.2	Ingestão alimentar	110
4.2.3	Estado nutricional e composição corporal	111
4.2.4	Análise da formação e reabsorção óssea.....	112
5	CONCLUSÃO	119
	REFERÊNCIAS.....	121
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS TESTES DE ANÁLISE SENSORIAL	139
	APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO CLÍNICO.....	143
	APÊNDICE C - QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS SOCIOECONÔMICOS E DEMOGRÁFICOS DOS CONSUMIDORES PARTICIPANTES DA ANÁLISE SENSORIAL	149
	APÊNDICE D - FICHA PARA AVALIAÇÃO SENSORIAL DO TESTE DE ORDENAÇÃO PREFERÊNCIA	153
	APÊNDICE E - FICHA PARA AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS TESTES DE ACEITABILIDADE E INTENÇÃO DE COMPRA.....	157
	APÊNDICE F - QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS SOCIOECONÔMICOS E DEMOGRÁFICOS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO CLÍNICO.....	161
	ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO	167

1 INTRODUÇÃO

O soro de leite é um subproduto da indústria de laticínios que representa a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação de queijo. Apresenta-se como um líquido opaco e de cor amarelo-esverdeada (GUIMARÃES et al., 2010) e representa de 80 a 90% do volume total do leite utilizado durante a produção de queijos, contendo aproximadamente, 55% dos nutrientes do leite, tais como proteínas solúveis, lactose, vitaminas, minerais e uma quantidade mínima de gordura (ALVES et al., 2014).

O soro é um dos efluentes líquidos que mais contribuem para a alta carga poluidora das indústrias de laticínios devido ao seu elevado conteúdo de substâncias orgânicas, associado principalmente à presença de lactose e proteínas, o seu poder poluente é considerado alto, com uma demanda bioquímica de oxigênio que varia de 27 a 60 kg·m⁻³ (PRAZERES et al., 2012).

Este subproduto já foi considerado uma matéria-prima de aproveitamento oneroso para a indústria de lácteos, porém, cada vez mais, as regulamentações ambientais exigem das indústrias de laticínios um plano de tratamento ou reaproveitamento deste soro (GERNIGON et al., 2010 apud ALVES et al. 2014). Na atualidade estão cada vez mais conscientes das características de sustentabilidade dos produtos que compram e, como resultado, uma questão chave para as indústrias de laticínios é garantir que a produção leiteira, especialmente queijos, é realizada com sustentabilidade (KIM et al., 2013).

O soro pode ser utilizado na sua forma original para produção de bebidas lácteas. Porém, considerando o seu alto teor de água e a finalidade de agregar valor ao produto e a seus derivados, o soro pode ser concentrado. O produto concentrado é classificado, então, de acordo com o teor de proteína, e pode ter aplicações diversas, devido a suas características nutricionais e tecnológicas, que vão do seu uso como ingrediente alimentício à produção de medicamentos (ALVES et al., 2014).

Dentre os produtos derivados de soro comercialmente disponíveis estão o concentrado proteico de soro (*whey protein concentrate*) que é o produto obtido pela remoção de constituintes não proteicos do soro de forma que o produto final seco contenha, em geral, entre 35% e 80% de teor proteico e o isolado proteico de soro (*whey protein isolate*) que é a forma comercial mais pura das proteínas do soro e contém entre 80 e 95% de proteína (BRANS, 2006).

O valor biológico das proteínas do soro é alto comparado ao de outras proteínas, por apresentarem em sua composição alto conteúdo de aminoácidos essenciais. Além disso, essas proteínas contêm uma alta concentração de aminoácidos de cadeia ramificada como leucina,

isoleucina e valina (MARSHALL, 2004) e, também, mais aminoácidos contendo enxofre, tais como cisteína e metionina quando comparadas à caseína. Esses aminoácidos sulfurados apresentam importância pela sua capacidade de melhorar a função imunológica e seu estado antioxidante (BAUMAN et al., 2006).

As proteínas do soro apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações nutricionais de consumo da *Food and Agriculture Organization (FAO)/World Health Organization (WHO)*, com exceção dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) que embora não estejam presentes em excesso, atendem às recomendações para todas as idades (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; PAGNO et al., 2009; SGARBIERI, 2004).

As proteínas do soro do leite poderão exercer vários efeitos benéficos ao organismo, devido às propriedades funcionais fisiológicas, dentre elas está a atividade imunomoduladora, antimicrobiana e antiviral, anticâncer, antiúlcera, proteção ao sistema cardiovascular e benefícios à atividade esportiva (SGARBIERI, 2004), além dos benefícios ao metabolismo ósseo (IOF, 2006; FAO, 2013).

Um dos mecanismos pelos quais o aumento da ingestão de proteínas pode ter efeitos favoráveis no metabolismo ósseo é através do aumento dos níveis sanguíneos de IGF-1, considerado composto chave na promoção da formação óssea (RIZZOLI; BONJOUR, 2004). Os níveis sanguíneos de IGF-1 são extremamente sensíveis às flutuações de ingestão de proteínas na dieta. Em um estudo em que adultos receberam suplementos de leite em suas dietas e, com isso houve um aumento na proteína ingerida, foram verificados aumentos significativos nos níveis sanguíneos de IGF-1 em comparação com o grupo controle (HEANEY et al., 1999). Além disso, estudos sugerem que certos aminoácidos podem promover a absorção intestinal de cálcio (KERSTETTER et al., 2005). Segundo Toba et al. (2000), a cistatina C, presente no leite, é um dos componentes ativos para a prevenção da reabsorção óssea, por inibir a cathepsina que é uma protease segregada por osteoclastos, responsável pela reabsorção óssea. Outro estudo de Toba et al. (2001), utilizando concentrado proteico do soro do leite, verificou promoção da formação óssea e supressão da reabsorção óssea em homens adultos saudáveis.

Para a pesquisa e o desenvolvimento de alimentos, a inovação em produtos alimentícios torna-se cada vez mais desafiadora, à medida que procura atender à demanda dos consumidores por produtos que, concomitantemente, sejam saudáveis e atrativos. O soro de leite constitui um subproduto de elevado valor nutricional e a procura de tecnologias que visam seu aproveitamento é necessária.

A aveia, além do excelente valor nutricional, possui propriedades tecnológicas e sensoriais vantajosas. Pode ser utilizada como ingrediente na panificação devido às suas

excelentes propriedades de absorção de umidade, que retardam o envelhecimento de pães, bolos e biscoitos. Além disso, seus derivados têm habilidade de estabilizar componentes lipídicos em razão de suas propriedades antioxidantes (SEABRA et al., 2002).

Neste contexto, o objetivo principal é utilizar concentrado proteico de soro de leite no desenvolvimento de biscoitos tipo cookies, por ser um produto de fácil incorporação de ingredientes devido a sua praticidade na produção e avaliar suas propriedades tecnológicas, nutricionais e sensoriais, além de investigar seu efeito na remodelação óssea. Nos objetivos específicos, enquadra-se a formulação dos biscoitos com diferentes proporções de concentrado proteico do soro de leite e aveia, a avaliação das características físicas, químicas e nutricionais dos biscoitos das diferentes formulações, a avaliação sensorial através de testes de ordenação preferencial, aceitabilidade global e intenção de compra e a realização de um estudo *in vivo* com mulheres adultas, avaliando formação e reabsorção óssea, estado nutricional, composição corporal e ingestão alimentar.

Este estudo está inserido no projeto “Valoração de soro de leite através de processos de filtração por membranas e bioprocessos”, desenvolvido pelo Professor Coordenador Dr. Vandrê Barbosa Brião da Universidade de Passo Fundo, que tem como objetivo desenvolver processos e produtos para a valoração de soro de leite, possibilitando agregar valor a este importante subproduto da indústria de laticínios. Além disso, se enquadra na linha de pesquisa “Qualidade e propriedades funcionais de alimentos” e no projeto de pesquisa “Avaliação de propriedades funcionais e nutracêuticas de bioprodutos e compostos”, por ser um projeto de desenvolvimento de um produto utilizando dois ingredientes funcionais (concentrado proteico do soro de leite e aveia) e a avaliação de seus benefícios à saúde humana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SORO DE LEITE

A fabricação de queijo é um método de transformação de componentes do leite em um produto de fácil conservação, menor volume, alto valor nutritivo, sabor agradável e boa digestibilidade (GRANDI, 1983). Neste processo não há conversão de cem por cento da matéria-prima leite no produto queijo. Seu rendimento pode variar entre 8,5 e 20% em função da consistência do queijo (DUMAIS, et al., 1991), produzindo assim, além do queijo, um derivado denominado de soro de leite. Na produção de 1 kg de queijo tem-se uma produção média de 9 litros de soro. Esse contém mais da metade dos sólidos presentes no leite original, incluindo grande parte da lactose, proteínas do soro (20% da proteína total), sais minerais e vitaminas solúveis (ATRA et al., 2005). Sua composição depende da composição química do leite que varia de acordo com a alimentação, reprodução, diferença individual de cada animal e do clima (ALVES et al., 2014).

O soro de leite pode ser obtido em laboratório ou em indústrias de processamento de leite por três operações principais: pela coagulação enzimática, resultando na coagulação das caseínas, matéria-prima para a produção de queijos, e no soro doce; pode ser obtido também pela precipitação ácida no pH isoeletrico das caseínas, resultando na caseína isoeletrica e no soro ácido; e por último, pela separação física das micelas de caseína por microfiltração, em membranas de 0,1 μm , obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro (MORIN et al, 2007). É definido como um subproduto da indústria de alimentos, relevante por seu volume e composição nutricional. É composto basicamente de 94 a 95% de água, 3,8 a 4,2% de lactose, 0,8 a 1,0% proteínas e 0,7 a 0,8% de minerais. Durante décadas, essa parte do leite era dispensada pela indústria, sendo somente a partir da década de 70, que os cientistas passaram a estudar as propriedades dessas proteínas (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; PAGNO et al., 2009). Acredita-se que aproximadamente 50% de todo o soro líquido produzido não é aproveitado, sendo este número ainda maior se forem consideradas as micro e pequenas empresas (LIRA et al., 2009).

Dentre as alternativas de utilização do soro de leite, podem ser citadas o uso do soro in natura para alimentação animal, fabricação de ricota, fabricação de bebida láctea, doce de leite, gelados comestíveis, achocolatados, sorvetes, substrato para fermentação e produção de aguardente, concentração, produção de soro em pó, separação das proteínas e lactose com

posterior secagem (COSTA et al., 2008; MADRONA; ZOTARELLI; BERGAMASCO, 2008; FASSIO et al., 2009; ZAVAREZE; MOARES; SALAS-MELLADO, 2010; EDUARDO; LANNES, 2004; SILVA; BOLINI; ANTUNES, 2004; BARBOSA et al., 2010), as quais constituem formas de valorização deste derivado lácteo, ao mesmo tempo contribuindo para a melhoria do meio ambiente e proporcionando ganhos às indústrias, porém cada alternativa, para ser aplicada, envolve análise econômica para sua viabilização, pois, em função do elevado teor de água, o uso de soro lácteo em produtos alimentícios convencionais tem sido bastante limitado, principalmente pelo custo de secagem (BORGES et al., 2001). O valor de mercado do soro de leite em pó é baixo, por outro lado, o concentrado proteico de soro de leite (CPS) pode atingir valores de mercado de até 20 vezes mais que o soro em pó, chegando a R\$120,00/kg.

Os diferentes produtos de soro de leite são classificados com base em sua concentração de proteínas. O CPS é o produto obtido pela remoção dos constituintes não-proteicos do soro, contém alguma lactose, gordura e minerais, porém, a medida que o teor de proteína aumenta, o teor de lactose reduz gradativamente. O isolado proteico de soro de leite (IPS) é a forma comercial mais pura das proteínas do soro e contém quantidades muito reduzidas de gordura e lactose, podendo ser isenta destes compostos (ANTUNES, 2003; HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006; PAGNO et al., 2009; BRIÃO; TAVARES, 2012).

A concentração do soro leva à formação de produtos proteicos que podem ser utilizados como ingredientes, para melhorar as propriedades tecnológicas e funcionais dos alimentos (solubilidade, gelificação, viscosidade, emulsificação, formação de espuma) (BAUMAN et al., 2006).

2.1.1 Aspectos econômicos da produção de soro de leite

No Brasil, no 1º trimestre de 2015, a aquisição de leite por laticínios que estão sob algum tipo de serviço de inspeção sanitária foi de 6,128 bilhões de litros de leite. Ocorreram quedas de 6,2% em relação ao trimestre imediatamente anterior e de 1,0% frente ao 1º trimestre de 2014. No ranking nacional da aquisição de leite, Minas Gerais está na liderança, seguido por Rio Grande do Sul e Paraná (Tabela 1) (IBGE, 2016).

Tabela 1. Volume de leite cru adquirido pelos laticínios no 1º trimestre de 2015 no Brasil.

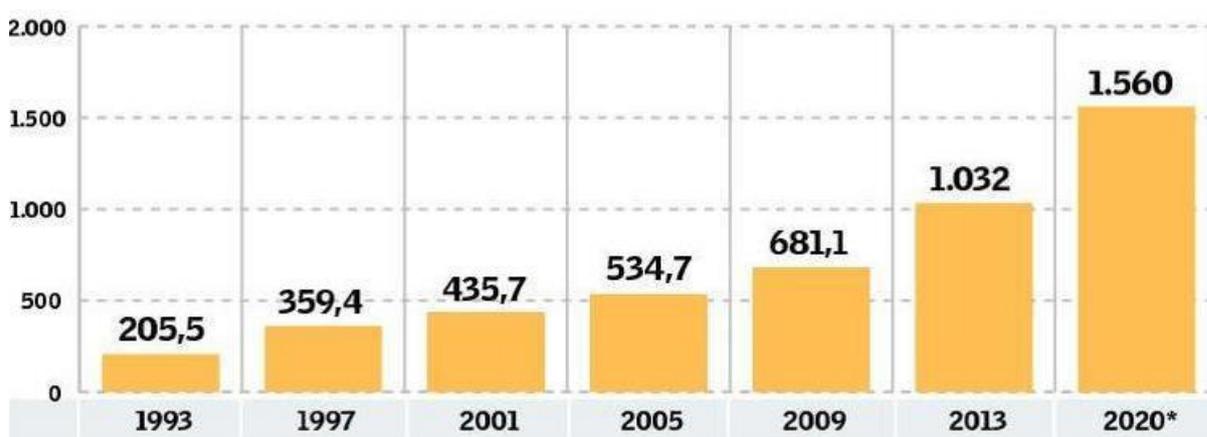
Classe de leite cru adquirido pelos laticínios (litros por trimestre)	Volume de leite cru adquirido	
	1 000 litros	%
Total	6 127 998	100
Até 100 mil	25 867	0,4
Mais de 100 mil a 1 milhão	309 809	5,1
Mais de 1 milhão a 10 milhões	1 594 564	26,0
Mais de 10 milhões	4 197 758	68,5

Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa Trimestral do Leite, 2016.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), dos 33 bilhões de litros de leite produzidos no Brasil anualmente, 32% são destinados a fabricação de queijos. Do total de 1,032 milhão de toneladas de queijos consumidas no Brasil em 2013 (Figura 1), uma fatia de 3% foram produtos importados, conforme os dados da ABIQ. Os números só consideram queijos fabricados por empresas com algum tipo de inspeção sanitária (federal, estadual ou municipal) (ABIQ, 2014).

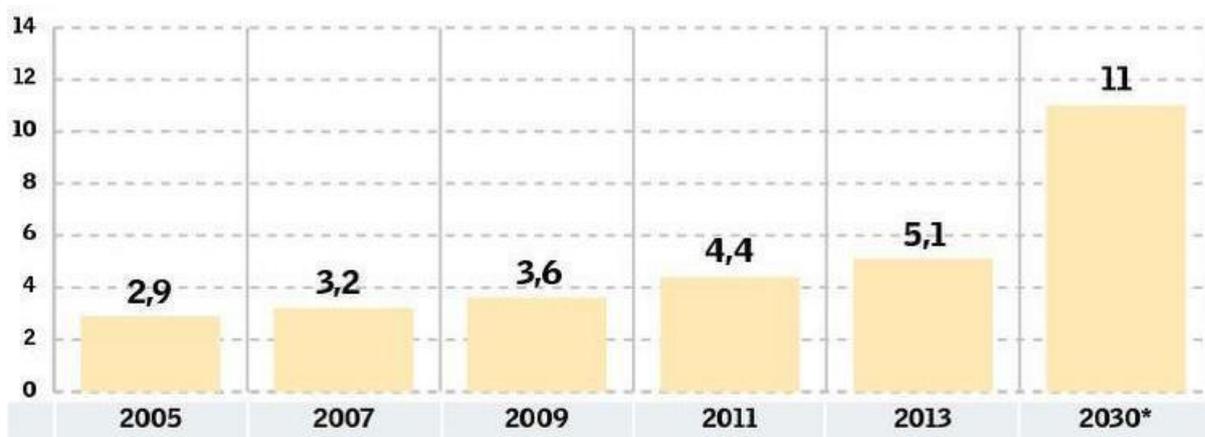
O consumo per capita de queijos no Brasil deverá alcançar 11 quilos, em média, em 2030, depois de ter avançado 76% entre 2005 e 2013 (Figura 2). Considerando o consumo total, o avanço foi de 8% a 9% ao ano, em média, nos últimos anos (ABIQ, 2014).

Figura 1. Produção total de queijos no Brasil (em mil toneladas).



Fonte: ABIQ, 2014.

Figura 2. Consumo per capita de queijos no Brasil (em quilos).



Fonte: ABIQ, 2014.

Apesar do elevado volume de soro de leite produzido anualmente no Brasil, o país importa um alto volume deste coproduto, pois seu beneficiamento requer a aplicação de tecnologias ainda não adaptadas à realidade nacional (ALVES et al., 2014).

2.2 CONCENTRADOS PROTEICOS DE SORO DE LEITE

Entre as técnicas utilizadas para a recuperação das proteínas do soro podemos citar a tecnologia de separação por membranas, em especial a ultrafiltração, que é utilizada para recuperar as proteínas solúveis do soro. Os componentes de baixa massa molar como lactose, sais e água permeiam através da membrana de ultrafiltração, a qual retém as moléculas de proteína. Muitas vezes a ultrafiltração é operada no modo de diafiltração e permite uma maior remoção de sais e lactose. Após a separação e concentração, o líquido rico em proteínas pode ser desidratado em secadores do tipo *spray dryers*, apresentando-se comercialmente na forma de um pó seco para utilização como ingrediente da indústria de alimentos ou mesmo para consumo direto (BRIÃO; TAVARES, 2012; BRIÃO; TAVARES, 2007; CROGUENNEC et al., 2006).

Os processos de separação por membranas, entre eles a ultrafiltração, apresentam alta eficiência energética, consumindo pouca energia, não necessitam da adição de produtos químicos e ocupam pequeno espaço físico. É um método de separação em plena expansão, embora ainda pouco utilizado comercialmente no Brasil (BRIÃO; TAVARES, 2012; BRIÃO; TAVARES, 2007).

Segundo Brans et al. (2004), desde 1981, a ultrafiltração se tornou uma das técnicas mais utilizadas para recuperar as proteínas solúveis do soro, além disso o uso da diafiltração, um modo de operação da ultrafiltração, onde ocorre a adição de água em algumas etapas durante o processo de concentração, foi um fator significativo para a intensificação do uso desse processo na purificação e concentração das proteínas.

Os CPS têm uma vasta aplicação na indústria alimentícia, pois além das propriedades nutricionais, são conhecidos pela versatilidade funcional tecnológica sob a forma de ingredientes em alimentos. Seu uso está aumentando extensivamente, conforme tem aumentado a capacidade tecnológica das indústrias para sua produção. Podem ser utilizados na produção de sorvetes, iogurtes, ricota, produtos de panificação, carnes, alimentos infantis, produtos de confeitarias, bebidas lácteas e como suplemento alimentar (ANTUNES, 2003). O CPS pode ainda ser utilizado para enriquecimento de alimentos com baixo teor de proteínas, melhorando o valor nutricional destes alimentos, pois suas proteínas são de alta digestibilidade e alto valor biológico (WIT, 1998).

O sabor amargo e ácido são os atributos mais limitantes do uso de CPS em produtos alimentícios (QUACH et al., 1999). Para facilitar sua aplicação seu sabor deve ser suave, porém o mesmo é altamente variável, devido à fonte original de soro de leite, processamento e armazenamento (MAHAJAN et al., 2004).

As proteínas do soro apresentam propriedades físicas e funcionais no seu estado nativo, e também após tratamento físico, químico ou enzimático, em função das várias estruturas conformacionais que possuem. São moléculas estruturalmente ordenadas e qualquer alteração na conformação leva à desnaturação. Algumas causas de desnaturação são temperatura, radiação ultravioleta, concentração salina, alterações de pH ou ação mecânica. Com a desnaturação, ocorre modificação da conformação globular das proteínas para a forma linear, com a perda da estrutura terciária da cadeia peptídica, e a formação de novos enlaces entre moléculas, que tornam as proteínas quimicamente mais reativas (WALSTRA et al., 2006 apud ALVES et al., 2014).

Entre as propriedades funcionais do CPS, pode-se destacar a solubilidade, emulsificação, formação de espuma e gelificação. O CPS é solúvel em uma ampla faixa de pH (2-10), o que possibilita sua aplicação em variados tipos de bebidas para esportistas, com possibilidade de fornecimento de proteínas em quantidades similares às contidas em uma refeição diária. A capacidade de absorver água e as características de gelificação permitem sua aplicação como ingrediente em produtos assados e em carne processada, melhorando a consistência. Seu poder emulsificante é maior do que do leite desnatado e da caseína, essa

característica se faz importante na formulação de molhos para saladas, cremes artificiais de café, bebidas nutricionais e sopas. Quando a proteína não é desnaturada, apresenta boa capacidade espumante, característica explorada na fabricação de bolos. Auxilia na ligação de água e previne a perda de gordura no cozimento (ANTUNES, 2003; USDEC, 2014 apud ALVES et al., 2014). A Tabela 2 resume algumas aplicações industriais dos concentrados proteicos de soro.

Tabela 2. Exemplos de propriedades tecnológicas e funcionais conferidas a alimentos por concentrados proteicos de soro de leite.

Propriedade funcional	Setor alimentar	Percentual de proteína	Aplicações
Viscosidade	Sobremesas	35	Chocolates, marshmallow, nougat, barras de cereais, glacê
Solubilidade, estabilidade coloidal	Bebidas	35	Bebidas fortificadas com proteínas, bebidas isotônicas, piña colada, bebidas gaseificadas, chás gaseificados, bebidas para crianças, sucos, iogurtes, bebidas substituintes de refeições.
Emulsificação	Sopas, alimentos infantis	85	Sopas com baixo teor ou zero gordura, molhos para saladas, queijos fundidos.
Formação de espuma	Confeitaria	35	Glacê, creme de leite UHT, chantilly, chocolates aerados.
Gelificação	Produtos lácteos	65	Iogurte, frozen yogurt, sorvete.
Elasticidade	Panificação	65	Brownie, bolo, cookies, pães, muffins, massa para pizza, biscoitos, waffles.
Absorção de água e gordura	Produtos de carne	85	Salsicha, bife de hambúrguer, presunto, nuggets e embutidos.

Fonte: Adaptado de USDEC, 2014 apud Alves et al. (2014).

2.3 PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE E SAÚDE

As proteínas do leite compreendem duas frações principais: as caseínas (80%) e as proteínas do soro (20%) (ALVES et al., 2014). As proteínas do soro são solúveis em ampla faixa de pH, apresentam estrutura globular e contêm pontes dissulfeto, que conferem um determinado grau de estabilidade estrutural. As duas principais frações proteicas do soro são β -lactoglobulina e α -lactoalbumina que estão presentes em maior concentração, constituem, aproximadamente, 70% das proteínas totais do soro e são responsáveis pelas propriedades funcionais, predominantemente a formação de espuma e a geleificação. Além dessas, são encontradas a albumina do soro bovino, imunoglobulina, glicomacropéptido e subfrações, que se apresentam em pequenas concentrações no leite, como lactoferrina, lisozima, lactoperoxidase, entre outras (HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006; METSÄMUURONEN; NYSTRÖM, 2009; AIMUTIS, 2004).

A β -lactoglobulina é o maior peptídeo do soro (45 % a 57 %), representa, aproximadamente, 10% da proteína total do leite e 50% da proteína do soro. Apresenta médio peso molecular (18,4-36,8 kDa), o que lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, sendo, portanto, absorvida no intestino delgado. É o peptídeo que apresenta maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada, com cerca de 25,1%. Importante carreadora de retinol (pró vitamina A) materna para o filhote, em animais (HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006). Devido à abundância desta proteína no leite bovino, as propriedades dos concentrados proteicos de soro de leite bovino são, na verdade, as propriedades da β -lactoglobulina (YADA, 2004 apud ALVES et al., 2014).

A α -lactoalbumina é o segundo peptídeo do soro (15%-25%) do leite bovino, em termos quantitativos. Com peso molecular de 14,2 kDa, caracteriza-se por ser de fácil e rápida digestão. Contém 123 aminoácidos, tendo o maior teor de triptofano (6%) entre todas as fontes proteicas alimentares, sendo, também, rica em lisina, leucina, treonina e cistina. A α -lactoalbumina é precursora da biossíntese de lactose no tecido mamário e possui a capacidade de se ligar a certos minerais, como cálcio e zinco, o que pode afetar positivamente sua absorção. Além disso, a fração α -lactoalbumina apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, como, por exemplo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (KELLEHER et al., 2003; LONNERDAL, 2003; HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006).

A albumina do soro bovino corresponde a cerca de 10% das proteínas do soro do leite. É um peptídeo de alto peso molecular (66 kD), rico em cistina (aproximadamente 6%), e relevante precursor da síntese de glutathione. Possui afinidade por ácidos graxos livres e outros

lipídeos, favorecendo seu transporte na corrente sangüínea (HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006). As imunoglobulinas são proteínas de alto peso molecular (150 -1 000 kDa). Quatro das cinco classes das imunoglobulinas estão presentes no leite bovino (IgG, IgA, IgM e IgE), sendo a IgG a principal, constituindo cerca de 80% do total. Suas principais ações biológicas residem na imunidade passiva e atividade antioxidante (LONNERDAL, 2003; HA; ZEMEL, 2003). As imunoglobulinas e albuminas do soro bovino oferecem proteção contra infecções, já que estimulam a produção de linfócitos (YADA, 2004 apud ALVES et al., 2014).

O glico-macropéptídeos (6,7 kDa) é um péptídeo resistente ao calor, à digestão assim como a mudanças de pH. Curiosamente, muitos autores não descrevem o glico-macropéptídeos como um péptídeo do soro. Na verdade, é um péptídeo derivado da digestão da caseína-kapa, pela ação da quimosina durante a coagulação do queijo. Essa fração está presente em um tipo de proteína do soro, conhecida como *whey rennet*. Apresenta alta carga negativa, que favorece a absorção de minerais pelo epitélio intestinal, e, assim como a fração BLG, possui alto teor de aminoácidos essenciais (47%) (ETZEL, 2004).

As sub-frações ou péptídeos secundários das proteínas do soro são assim denominadas por se apresentarem em pequenas concentrações no leite. Compreendem as sub-frações: lactoferrina, beta-microglobulinas, gama-globulinas, lacto-peroxidase, lisozima, lactolina, relaxina, lactofano, fatores de crescimento IGF-1 e IGF-2, proteoses-peptonas e aminoácidos livres. As subfrações lactoferrina, lisozima, lactoperoxidase, encontradas no leite humano, fornecem propriedades antimicrobianas importantes para o recém-nascido, assim como os fatores de crescimento IGF-I e IGF-II, que estão relacionados com o desenvolvimento do tubo digestivo (HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006; YADA, 2004 apud ALVES et al., 2014).

As proteínas do soro podem exibir diferenças na sua composição de macronutrientes e micronutrientes, devido a fatores como a fonte do leite, o método de produção, o tipo de queijo e o processamento (REZAEI et al., 2011). A composição centesimal do concentrado proteico do soro do leite é de 414 kcal, 80 g de proteína, 7 g de gordura e 8 g de carboidratos (HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006).

Em se tratando de aminoácidos essenciais, as proteínas do soro apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações, exceto pelos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) que não aparecem em excesso, mas atendem às recomendações para todas as idades. Apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SGARBIERI, 2004). Na Tabela 3 encontra-se a composição média de aminoácidos por grama de proteína do soro do leite, segundo Etzel (2004).

Tabela 3. Composição média de aminoácidos por grama de proteína.

Aminoácidos (mg)	Proteína do soro do leite isolada
Alanina	4,9
Arginina	2,4
Asparagina	3,8
Ácido aspártico	10,7
Cisteína	1,7
Glutamina	3,4
Ácido glutâmico	15,4
Glicina	1,7
Histidina	1,7
Isoleucina	4,7
Leucina	11,8
Lisina	9,5
Metionina	3,1
Fenilalanina	3,0
Prolina	4,2
Serina	3,9
Treonina	4,6
Triptofano	1,3
Tirosina	3,4
Valina	4,7

Fonte: Etzel (2004).

Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) perfazem 21,2% e todos os aminoácidos essenciais constituem 42,7%. Segundo Etzel (2004), esses valores estão acima da média, quando comparados àqueles de outras fontes protéicas, fornecendo às proteínas do soro importantes propriedades nutricionais. Em relação aos micronutrientes, possui, em média, 1,2mg de ferro, 170mg de sódio e 600mg de cálcio por 100g de concentrado protéico.

A qualidade ou balanço de uma proteína alimentar além de depender do tipo e da quantidade de aminoácidos essenciais depende da sua digestibilidade, que representa a medida da eficácia com que pode ser utilizada pelo organismo. Portanto, além da concentração de aminoácidos devemos ter em consideração a sua digestibilidade biológica. As proteínas do soro

apresentam elevada qualidade proteica quando comparada a outras proteínas (YADA, 2004 apud ALVES et al., 2014).

As proteínas do soro de leite são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, estimulando a síntese de proteínas sangüíneas e teciduais a tal ponto que alguns pesquisadores classificaram essas proteínas como proteínas de metabolização rápida *fast metabolizing proteins*, muito adequadas para situações de estresses metabólicos em que a reposição de proteínas no organismo se torna emergencial (SGARBIERI, 2004). Além disso, possuem componentes aos quais se atribuem algumas propriedades biológicas importantes como aumento da resposta imunológica, anticâncer, proteção contra problemas cardiovasculares, entre outras (BAUMAN et al., 2006).

Atletas, praticantes de atividades físicas, pessoas fisicamente ativas e até mesmo portadores de doenças, como intolerantes à lactose, vêm procurando benefícios nessa fonte protéica. Evidências recentes sustentam a teoria de que as proteínas do leite, incluindo as proteínas do soro, além de seu alto valor biológico, possuem peptídeos bioativos que atuam como agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, reguladores da função imune, assim como fatores de crescimento (LONNERDAL, 2003).

Toba et al. (2001) em um estudo com 30 homens adultos saudáveis, examinou o efeito da ingestão da proteína básica do leite por 16 dias. O estudo demonstrou que as proteínas do soro promoveram a formação dos ossos em humanos, estimulando a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos, aumentando a densidade mineral óssea e inibindo a reabsorção de cálcio. Toba et al. (2000) demonstraram que a cistatina C, componente do leite, suprimiu a reabsorção óssea, mediada por osteoclastos. Ainda concluiu que a cistatina C inibe a catepsina, uma protease secretada por osteoclastos que é responsável pela reabsorção óssea, considerando a cistatina como um componente ativo para a prevenção da reabsorção óssea.

Estudo realizado por Moreno (2002), realizado em Campinas, SP, comprovou o poder imunoestimulante e estimulador da síntese de glutathione em 18 crianças entre 1 e 6 anos de idade, portadoras de HIV. Elas foram suplementadas com concentrado de proteína de soro de leite ou placebo (maltodextrina) por 4 meses. Observou-se uma elevação nos níveis de linfócitos TCD4+, elevação da síntese de glutathione eritrocitária e redução na ocorrência de episódios infecciosos no grupo suplementado com concentrado de proteína de soro de leite.

A proteína é a parte central de uma dieta completa para adultos. Embora o crescimento físico ocorra apenas por um breve período da vida, a necessidade de reparar e remodelar a estrutura muscular e óssea continua durante toda a vida. A manutenção da saúde do músculo e

do osso é uma parte essencial do processo de envelhecimento e fundamental para manter a mobilidade, a saúde e os tecidos ativos do nosso corpo (LAYMAN, 2009).

A proteína é também um constituinte essencial do tecido ósseo e, por conseguinte, um fornecimento adequado pela dieta é essencial (IOF, 2006). A maioria dos estudos de observação demonstra uma associação positiva entre a ingestão de proteínas e a saúde dos ossos. Existem vários estudos epidemiológicos, tanto transversais como longitudinais, que relataram uma associação entre proteína dietética e óssea. Estes estudos revelam que os indivíduos que consomem mais proteína dietética têm maior densidade mineral óssea. Outros estudos prospectivos têm observado que indivíduos com maior consumo de proteína têm taxas mais lentas de perda óssea (PROMISLOW et al., 2002; RAPURI; GALLAGHER; HAYNATZKA, 2003; HANNAN et al. 2000).

Um dos mecanismos pelo qual a proteína dietética pode melhorar a massa óssea pode ser explicado pelo fato que o aumento da proteína dietética é também conhecido por aumentar níveis de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) circulante, e, inversamente, uma dieta pobre em proteínas diminui IGF-1. IGF-1 é um mediador chave de crescimento do osso, mas também possui um papel na resposta do esqueleto com terapia com hormônio paratireoidiano (PTH). O aumento da proteína dietética 0,85-1,55g/kg por dia resultou em níveis de circulação mais elevados de IGF-1 em homens e mulheres saudáveis (DAWSON-HUGHES et al., 2004).

Maior ingestão de proteínas na dieta está associada à melhoria na densidade mineral óssea e no metabolismo esquelético. Além disso, muitos alimentos ricos em proteínas, como carnes e laticínios também são ricos em fósforo e do potássio, os quais têm tendem a evitar a perda de cálcio na urina. Alguns aminoácidos promovem a absorção de cálcio, e, desde que a ingestão de cálcio seja adequada, o aumento dietético de proteínas promove melhora na densidade óssea (KERSTETTER et al., 2005).

Evidências crescentes sugerem que a recomendação de proteínas, segundo a Recommended Dietary Allowance (RDA), de 0,8g/kg por dia não é o ideal para a saúde óssea em pessoas idosas. Dietas com quantidade moderada de proteína, de 1,0 a 1,5g/kg por dia demonstram estar associadas à homeostase normal de cálcio, sem alterar o metabolismo ósseo (KERSTETTER et al., 2005).

Estes dados indicam que a duplicação da RDA entre 0,8g/kg por dia a 1,5 a 1,6g/kg por dia, pode resultar em melhor saúde óssea e do músculo em indivíduos idosos. Embora este nível é aproximadamente duas vezes a recomendação da RDA, ainda está dentro da faixa aceitável de ingestão (10% -35% do total de calorias). Uma recomendação de 1,0 a 1,2 g/kg por dia de

proteínas (ou aproximadamente 13% -16% do total de calorias) seria ideal para manter o metabolismo normal de cálcio e o balanço de nitrogênio, sem afetar a função renal. Muitas evidências científicas afirmam efeitos benéficos de ingestão de proteínas para a saúde óssea, e destacam os riscos associados à insuficiência de proteínas e desnutrição (PETERS; MARTINI, 2010).

2.4 AVEIA

A aveia tem recebido grande atenção por parte de médicos, nutricionistas, consumidores e entidades reguladoras devido às suas características nutricionais, e principalmente devido ao seu teor e qualidade das fibras alimentares, que varia entre 7,1 e 12,1%. Esta variação é devido aos métodos de determinação utilizados e às diferenças entre cultivares. A composição química e a qualidade nutricional da aveia são relativamente altas e superiores a dos demais cereais (GUTKOSKI; BONAMIGO; TEIXEIRA; PEDÓ, 2007).

As fibras alimentares, baseado na simulação da solubilidade intestinal, são usualmente classificadas em dois principais grupos: fibras solúveis e insolúveis. Dentre as fibras solúveis estão pectinas, β -glucanas, galactomananas, gomas e oligossacarídeos não digeríveis, incluindo a inulina. As fibras insolúveis incluem a celulose, hemicelulose e lignina (RODRÍGUEZ et al., 2006).

As β -glucanas, uma das frações da fibra alimentar localizadas nas paredes celulares dos grãos, com maior concentração na subcamada de aleurona, na camada de aleurona e no endosperma amiláceo adjacente, são de grande importância para a saúde humana e têm gerado interesse devido às respostas fisiológicas que produzem como fibra alimentar. As fibras alimentares, em especial as β -glucanas, apresentam propriedades como ingredientes funcionais e reduzem o risco de doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão e obesidade (GUTKOSKI; BONAMIGO; TEIXEIRA; PEDÓ, 2007).

Os produtos de aveia são empregados como ingredientes na indústria de alimentos em função de suas características como sabor, textura, capacidade de retenção de umidade e solubilidade. Em produtos de panificação a adição de aveia afeta a absorção de água na massa, o sabor e a textura do produto final. A escolha do tipo de flocos é dependente do resultado final desejado. Flocos grandes mantêm sua forma, enquanto flocos finos originam produtos de menor textura após o cozimento (GUTKOSKI; PEDÓ, 2000).

2.4.1 Propriedades físicas e tecnológicas das fibras

Além da importância das fibras alimentares para a alimentação humana, a indústria de alimentos utiliza fibras como importante fator tecnológico para o desenvolvimento dos produtos. A incorporação de fibras insolúveis em biscoitos, produtos cárneos cozidos, produtos de confeitaria, bebidas, molhos, sobremesas e iogurtes contribui para a redução de calorias, devido a sua alta capacidade de retenção de água, dando, portanto, maior volume aos produtos (LARRAURI, 1999).

Na elaboração de biscoitos, a inclusão de flocos de aveia confere crocância e sabor aos mesmos (GUTKOSKI; PEDÓ, 2000). Além disso, a adição de aveia influencia significativamente nas propriedades de massa. De acordo com Villemejeane et al. (2013), a adição de aveia influencia na absorção de água e na estabilidade da massa que é consideravelmente reduzida com a incorporação de aveia. As características tecnológicas, após o cozimento, também são afetadas pela adição de aveia nos biscoitos (SUDHA et al., 2007).

A presença das fibras pode contribuir para a cor e sabor dos produtos, além de aumentar os benefícios nutricionais devido a incorporação de fibras substituindo uma parte da farinha ou gordura. Alguns trabalhos mostram que a incorporação de fibras em produtos de panificação, biscoitos e barras de cereais pela adição de fibras de cereais, frutas, vegetais e celulose, por substituição de uma parte da farinha ou gordura, traz o acréscimo de benefícios nutricionais na presença das fibras (THEBAUDIN et al., 1997).

Algumas propriedades físicas das fibras, tais como a capacidade de retenção de água, capacidade de ligação de óleo e distribuição do tamanho das partículas consistem em aspectos importantes para a utilização das fibras em produtos alimentícios (ABDUL-HAMID; LUAN, 2000). Tais propriedades físicas das fibras possuem relação com componentes químicos, incluindo a celulose, hemicelulose e lignina (GRIGELMO-MIGUEL et al., 1999).

As propriedades de hidratação determinam a concentração de fibras a serem utilizadas em alimentos para que se obtenha uma textura desejável, sendo descritas pelos parâmetros capacidade de retenção de água, que é definida pela quantidade de água retida pela estrutura da fibra sem a aplicação de forças externas, exceto a força gravitacional e pressão atmosférica e capacidade de ligação de água que consiste na quantidade de água retida pela estrutura da fibra após a aplicação de forças externas/pressão, ou mais comumente, a centrifugação. Estes parâmetros não são relevantes para os polissacarídeos solúveis, entretanto, são atributos de polissacarídeos insolúveis (THEBAUDIN et al., 1997; RAGHAVENDRA et al., 2004).

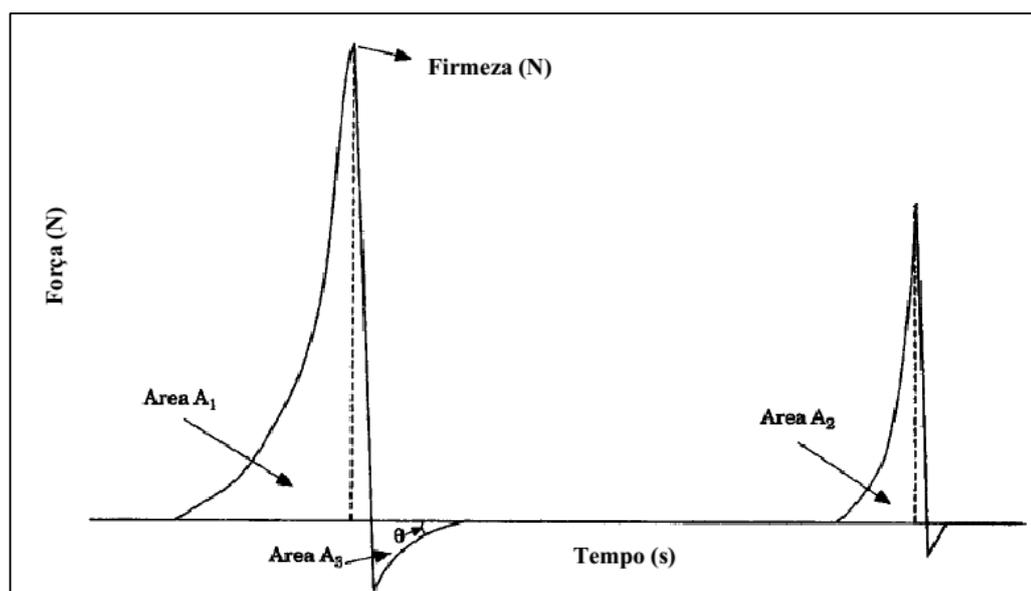
A capacidade de ligação de óleo, parâmetro também utilizado para determinar a utilização deste ingrediente em alimentos, pode melhorar a retenção de óleo pelas fibras, que normalmente são perdidas durante o cozimento. As fibras insolúveis podem reter acima de cinco vezes a sua massa em óleo. A agregação de óleo no produto confere, portanto, retenção de sabor, aumentando o rendimento tecnológico. Porém, a origem das fibras e o tamanho de sua partícula afetam a sua capacidade de ligação de óleo (THEBAUDIN et al., 1997).

2.5 TEXTURA

A textura é um importante atributo percebido pelos consumidores na aceitação de biscoitos. Muitos métodos instrumentais têm sido desenvolvidos para determinação das propriedades de textura de alimentos, sendo o mais comumente utilizado o método de análise do perfil de textura (HERRERO et al., 2007).

A análise de perfil de textura é realizada com a utilização de uma sonda afixada em coluna vertical, que comprime a amostra sobre uma base fixa causando a sua deformação. A sonda do equipamento retorna ao seu ponto de partida inicial e repete o procedimento, o que se assemelha a ação de duas mordidas sobre determinada amostra. Como resultado dessa análise, tem-se a obtenção de uma curva TPA (*Texture Profile Analysis*), conforme apresentada na Figura 3.

Figura 3. Gráfico representativo da análise do perfil de textura.



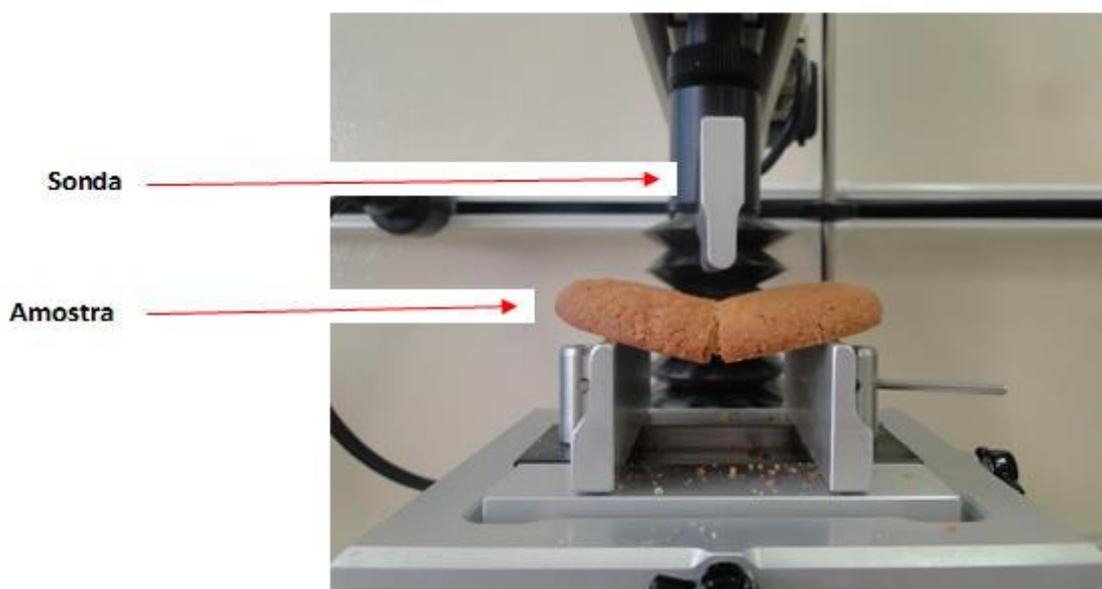
$A1 + A2$, Consistência (N.s); $A2 / A1$, Coesividade; $A3$, Adesividade (N.s); $(90 - \theta)^\circ$, Elasticidade

Fonte: Manohar; Rao (1999)

Os parâmetros de textura são determinados a partir da Análise do Perfil de Textura, através da curva TPA e definidos como firmeza, caracterizada como a força necessária para atingir a deformação, obtida a partir da máxima força durante a primeira compressão, adesividade, definida como o trabalho necessário para superar a força atrativa entre o alimento testado e a superfície da sonda, obtida a partir da área do pico negativo de força do primeiro ciclo de compressão e coesividade, que é a força entre as ligações internas do alimento, obtida através da razão entre a área de força positiva do primeiro e segundo ciclos de compressão; e elasticidade, razão pela qual o alimento deformado retorna à condição original após a remoção da força, obtida através da altura da amostra recuperada entre o fim do primeiro ciclo e o início do segundo ciclo de compressão (PARK, 2007).

O teste instrumental de textura tem sido desenvolvido para a identificação da resistência da amostra à força de deformação. Um dos métodos utilizados para avaliação de biscoitos tipo *cookie* consiste na avaliação da força de fratura inicial e firmeza (Figura 4).

Figura 4. Representação do analisador de textura em amostra de biscoito.



Fonte: Acervo do autor (2016).

A substituição de farinhas tradicionais por produtos alternativos com melhor valor nutricional está sendo muito estudada, principalmente na formulação de biscoitos. A principal

preocupação consiste na manutenção das características sensoriais e de textura, que são importantes fatores na aceitabilidade desse produto pelos consumidores.

Alguns autores avaliaram as características de textura em biscoitos, sendo os parâmetros de força de fratura e firmeza os mais destacados. Gallagher, Kenny e Arendt (2005) determinaram a firmeza de biscoitos contendo diferentes proporções de concentrado protéico de soro e carbonato de sódio. Singh et al. (2003) determinaram a força de fratura de biscoitos preparados com farinha de milho e farinha de batata de três cultivares. Conforti e Lupano (2004) investigaram a força de fratura de biscoitos contendo diferentes concentrações de mel, suco de limão e de dois concentrados protéicos de soro. McWatters et al. (2003) avaliaram a firmeza de biscoitos desenvolvidos com diferentes concentrações de farinha de trigo, fonio (*Digitaria exilis*) e cowpea (*Vigna unguiculata*). Lee e Brennan (2005) estudaram a influência de isolado protéico de soja em *cookies* fritos quanto aos parâmetros de firmeza e fraturabilidade.

2.6 COR

O aspecto e a cor da superfície dos alimentos são os primeiros parâmetros de qualidade observados pelos consumidores, e por consequência, são características muito importantes para a aceitabilidade de um produto, antes mesmo de sua degustação. A cor da superfície é a primeira sensação que o consumidor percebe e utiliza como ferramenta para a aceitação ou rejeição de um alimento. A observação da cor permite, então, a detecção de anomalias ou defeitos presentes em determinado produto (LEÓN et al, 2006).

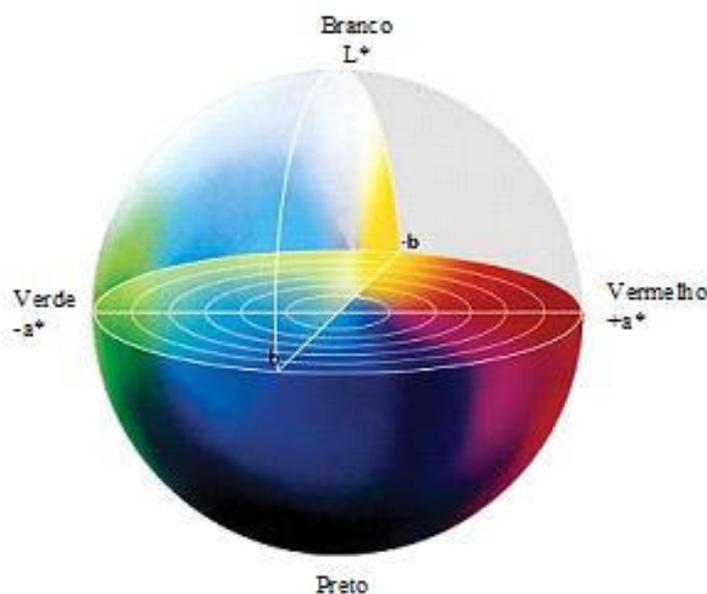
A determinação de cor pode ser realizada através da inspeção visual humana ou pela utilização de um instrumento de medida de cor, denominado colorímetro. A inspeção visual realizada por humanos consiste em uma prática mais rústica e subjetiva, que implica elevada variação nos resultados por conta da presença de alterações na iluminação, além das variações extremas entre um observador e outro. Por outro lado, a análise instrumental de cor é um método objetivo, no qual padrões de cor são utilizados como referência, facilitando a comparação entre as amostras. Devido a essas características é recomendável a determinação de cor através da utilização de um instrumento de medida (LEÓN et al, 2006).

Colorímetros, tais como Minolta Chroma Meter, Hunter Lab e Dr. Lange são alguns dos instrumentos mais utilizados para a determinação de cor, entretanto, estes apresentam uma desvantagem, já que a superfície a ser medida deve ser uniforme e pequena, dificultando a análise global da superfície dos alimentos (MENDOZA; AGUILERA, 2004).

Usualmente, a cor de alimentos tem sido medida através do sistema $L^* a^* b^*$ ou CIELab, considerado padrão internacional para medidas de cor e adaptado pela *Comission Internationale d'Eclairage* (CIE) em 1976 (LEÓN et al, 2006).

O sistema CIELab é uma aproximação matemática simplificada para um espaço de cor uniforme composto pelas diferenças de coloração percebidas (Figura 5). O parâmetro L^* representa a luminosidade (0 a 100), caracterizando a variação de cor do preto ao branco ou do escuro ao claro. O parâmetro a^* representa a variação de cor do vermelho ao verde no eixo positivo e negativo, respectivamente. O parâmetro b^* representa a variação de cor de amarelo (eixo positivo) a azul (eixo negativo) (DUANGMAL; SAICHEUA; SUEEPRASAN, 2008).

Figura 5. Representação dos parâmetros de cor de acordo com o sistema CIELab.



Fonte: Williams (2002).

Muitos trabalhos que desenvolveram biscoitos com farinhas alternativas determinam os parâmetros de cor dos produtos, com o objetivo de identificar variações em função da adição de uma nova farinha ou ingrediente.

2.7 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial é definida como a análise de alimentos ou outros materiais por meio dos sentidos, constituindo-se de uma ciência multidisciplinar, que compreende a medição, interpretação e o entendimento das respostas humanas para determinada propriedade do produto, percebido através dos sentidos da visão, olfação, paladar, tato e audição (PIGGOTT; SIMPSON; WILLIAMS, 1998). A análise sensorial foi definida como disciplina científica em 1975 pelo IFT (Institute of Food Technology).

Segundo Meilgaard, Civille e Carr (2007) a avaliação sensorial pode ser definida como a medição e quantificação das características de um produto, ingrediente ou modelo, sendo estes percebidos através dos sentidos humanos. Normalmente os atributos observados em um produto são na seguinte ordem: aparência, odor/aroma, consistência ou textura e sabor. Deve-se considerar que no processo global de percepção os atributos sobrepõem-se, uma vez que, todas as impressões surgem quase que simultaneamente.

A análise sensorial é uma importante ferramenta utilizada para o desenvolvimento de novos produtos, reformulação dos produtos já estabelecidos no mercado, estudo de vida de prateleira, determinação das diferenças e similaridades apresentadas entre produtos concorrentes, identificação das preferências dos consumidores por determinado produto, otimização e melhoria da qualidade (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007).

Segundo Piggot, Simpson e Williams (1998) a análise sensorial utiliza princípios traçados pela ciência dos alimentos, fisiologia, psicologia e estatística, para que tenhamos respostas objetivas às propriedades dos alimentos, percebidas através dos sentidos. Técnicas sensoriais devem satisfazer os requerimentos de todos os métodos mensuráveis, devendo estes serem corretos, precisos e válidos para determinado estudo.

Segundo Guerrero et al. (2000), a seleção de alimentos é um fenômeno complexo influenciado por diversos fatores, os quais podem ser classificados como aqueles relacionados ao marketing, à psicologia e às características sensoriais do alimento. O sabor é o fator primário envolvendo a aceitabilidade e intenção de compra de uma variedade de categorias de alimentos, incluindo alimentos funcionais (GRUNERT; BECH-LARSEN; BRED AHL, 2000; VERBEKE, 2006).

O mercado para produtos contendo ingredientes funcionais vem se modificando continuamente e a competição pela conquista do consumidor torna-se cada dia mais intensa (MENRAD, 2003). Alguns fatores são considerados peças chaves na intenção de compra pelo

consumidor, como sabor, qualidade, preço, conveniência e efeitos de alimentos funcionais sobre a saúde (URALA; LÄHTEENMÄKI, 2007).

Para realização de análise sensorial, empregam-se diferentes métodos de avaliação, visando determinar o perfil sensorial, a aceitação e preferências acerca de um produto específico. Os métodos sensoriais podem ser divididos em dois grupos: métodos discriminativos e métodos descritivos. Para os métodos discriminativos, a finalidade dos testes é simplesmente indicar se os produtos testados são percebidos diferentes, enquanto os métodos descritivos têm por objetivo identificar e medir a composição de produtos ou determinar a presença ou intensidade de uma determinada característica (PIGGOT; SIMPSON; WILLIAMS, 1998).

Os métodos discriminativos caracterizam-se por estabelecer se existem diferenças entre duas ou mais amostras e, em alguns casos, a magnitude dessa diferença; os métodos descritivos descrevem qualitativa e quantitativamente as amostras. Já os métodos afetivos, ou testes com consumidores, são utilizados para mensurar quanto uma determinada população alvo gosta ou não de um produto, determinando preferência ou aceitabilidade (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007).

Segundo o *Institute of Food Technology/Sensory Evaluation Division* (1981) o teste de preferência baseia-se na medida de preferência do julgador ou medidas pelas quais se determina a preferência relativa. O teste de preferência é normalmente aplicado em comparações diretas entre um produto e outro, com a finalidade de aperfeiçoamento ou com produtos competitivos, forçando uma escolha de um dos itens sobre outro ou outros produtos avaliados (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007).

O teste de aceitabilidade é um método afetivo bastante empregado para verificar a aceitação ou rejeição de um produto pelos consumidores. Nele são utilizadas escalas categorizadas, que podem apresentar diferentes números de categorias, sendo a mais utilizada a escala hedônica de nove pontos, ancorada nos extremos pelas expressões “gostei muitíssimo” e “desgostei muitíssimo” (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007). Segundo Bergara-Almeida e Silva (2002) a escala hedônica deve ser estruturada nas expressões “gostei levemente”, “moderadamente”, “muitíssimo” ou “extremamente”, sendo de fácil utilização pelos consumidores.

2.8 DIGESTIBILIDADE CORRIGIDA PELO ESCORE DE AMINOÁCIDOS

As proteínas dietéticas diferem na sua capacidade para satisfazer a demanda metabólica para os nove aminoácidos indispensáveis na dieta e nitrogênio. A digestibilidade é medida pela absorção de aminoácidos correspondentes ao padrão de exigência fundamental para a qualidade nutricional de proteínas individuais e misturas de proteínas. No passado, a qualidade da proteína era medida meramente em experiências de crescimento com ratos e expresso em parâmetros como PER (Protein Efficiency Ratio) e NPU (Utilização Protéica Líquida). O PER compara a resposta de crescimento de ratos jovens, alimentados com uma quantidade de proteína de teste, com a de ratos controle, alimentados com uma quantidade semelhante de caseína, e o NPU é o produto da digestibilidade (digestão e absorção) e o valor biológico (a quantidade de nitrogênio utilizados dividido pela quantidade de nitrogênio absorvida). A principal desvantagem destes métodos é que o padrão de aminoácidos de ratos não é idêntico ao de seres humanos e, portanto, a única medida correta de qualidade da proteína é a avaliação do balanço de nitrogênio em humanos. Esta é, no entanto, muito cara para uso rotineiro (SCHAAFSMA, 2012).

Portanto, em 1989, especialistas da FAO/OMS, em uma avaliação da qualidade da proteína concluíram que a qualidade da proteína poderia ser adequadamente avaliada expressando o conteúdo do primeiro aminoácido limitante indispensável na proteína com uma fração do conteúdo do aminoácido correspondente em um padrão de referência determinada como ideal e, posteriormente, multiplicando essa pontuação de aminoácidos pela digestibilidade verdadeira fecal (%), conforme medido em um ensaio com ratos (SCHAAFSMA, 2012).

A digestibilidade ileal baixa da proteína, o que aumenta, assim, o fluxo de nitrogênio para o cólon, aumenta a formação bacteriana de compostos tóxicos, tais como amoníaco e fenóis. Por estas razões, o uso da digestibilidade ileal em suínos fistulados, em vez da digestibilidade fecal em ratos, tem sido proposto como uma melhor abordagem para a avaliação de valores de PDCAAS (DARRAGH; HODGKINSON, 2000).

A vantagem da utilização de suínos é também que a fisiologia gastrointestinal desta espécie assemelha-se mais estreitamente à dos humanos. Deglaire et al. (2009) avaliou a aptidão de suínos como modelos animais para a previsão de digestibilidade proteica em humanos e seus resultados apoiam a utilização de suínos como um modelo para prever as diferenças entre digestibilidade da proteína, especialmente em relação a digestibilidade verdadeira ileal em humanos.

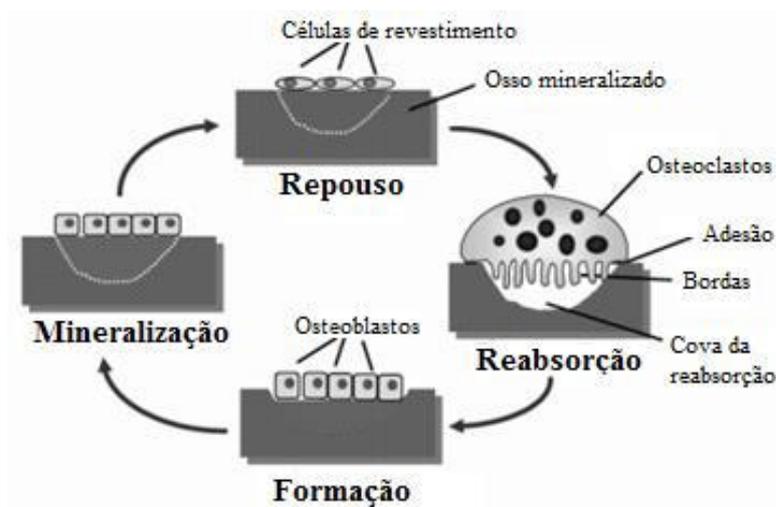
Embora digestibilidade corrigida pelo escore de aminoácidos (PDCAAS) é um método rápido e relativamente barato para a avaliação da qualidade da proteína, ele ainda precisa mais experiências com animais para a medição da digestibilidade verdadeira. Considerando-se a opinião pública negativa sobre o uso de animais para a investigação, seria uma vantagem quando a medição da qualidade da proteína pudesse ser realizada *in vitro*. A vantagem da medição da digestibilidade *in vitro* é de ser um método que pode imitar as condições fisiológicas de diferentes espécies animais, de modo que se torna possível avaliar os coeficientes de digestibilidade espécie-específicos (SCHAAFSMA, 2012).

Schaafsma (2012) conclui que a medição da digestibilidade verdadeira fecal em ratos deve ser substituída por uma medição da digestibilidade da proteína verdadeira ileal, preferencialmente em suínos, ou por uma medição *in vitro*.

2.9 REMODELAÇÃO ÓSSEA

O osso é um tecido metabolicamente ativo que sofre remodelação contínua por dois processos, a formação óssea e reabsorção óssea, um fenômeno que nos acompanha ao longo da vida, sendo fundamental para renovação do esqueleto e preservação de sua qualidade. A reabsorção é seguida da formação óssea em ciclos constantes orquestrados pelas células do tecido ósseo, que incluem osteoclastos (reabsorção), osteoblastos (formação) e osteócitos (manutenção). Sob condições normais, a reabsorção óssea e formação estão firmemente acoplados uns aos outros, sendo que a fase de reabsorção (osteoclastos) leva aproximadamente 10 dias, que é seguida por uma fase de formação (osteoblastos), que pode durar até 3 meses, de modo que a quantidade de osso removido é sempre igual à quantidade de osso recentemente formado (Figura 6) (SEIBEL, 2005).

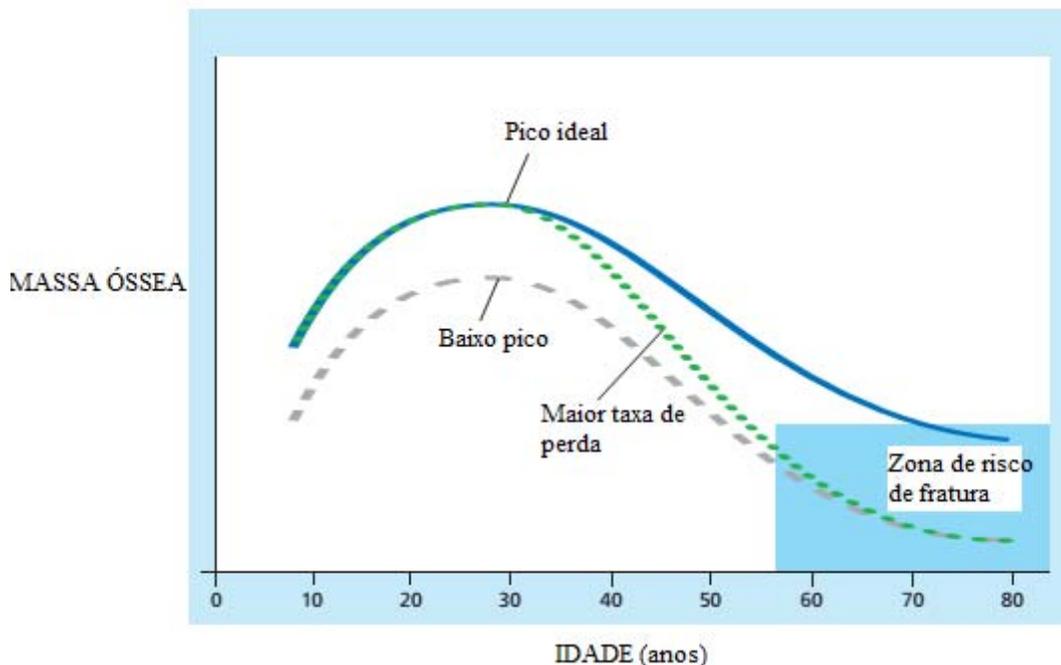
Figura 6. Ciclo de remodelação óssea.



Fonte: Adaptado de Seibel (2005).

Os anos críticos para a construção da massa óssea são durante a infância e a adolescência. O pico da massa óssea é alcançado em meados dos anos 20. Em seguida, a massa óssea mantém-se estável durante o início da vida adulta. A perda óssea começa após a idade de cerca de 40 em ambos os sexos. A Figura 7 mostra uma representação de mudanças da massa óssea ao longo da vida. Nesta Figura também observamos duas situações hipotéticas, uma em que é obtido um baixo pico de massa óssea (tracejado cinza) e outra em que a perda de massa óssea é mais rápida do que deveria ser (pontilhado verde). Em ambas as situações, isso colocaria uma pessoa em risco de fratura mais cedo. Manter hábitos de vida saudáveis, como boa nutrição e exercícios físicos, ajudam a garantir que os indivíduos atinjam seu pico máximo de massa óssea e também ajudam a retardar a perda óssea, garantindo a permanência na linha ideal (sólido azul) (IOF, 2006).

Figura 7. Alterações da massa óssea ao longo da vida.



Fonte: Adaptado de IOF (2006).

O equilíbrio da remodelação óssea é alcançado e regulado através da ação de vários hormônios sistêmicos (por exemplo, PTH, vitamina D, outros hormônios esteróides) e mediadores locais (por exemplo, citocinas, fatores de crescimento). Em contraste, o crescimento somático, envelhecimento, doenças ósseas metabólicas, estados de mobilidade aumentada ou diminuída, muitas intervenções terapêuticas e outras condições são caracterizados por desequilíbrios, maiores ou menores, na remodelação óssea. Enquanto a estrutura óssea e a força são difíceis de medir *in vivo*, a massa óssea pode ser avaliada por meio de técnicas de densitometria. Em contraste com estas medidas, os marcadores moleculares do metabolismo ósseo são ferramentas úteis para detectar a dinâmica do próprio desequilíbrio metabólico (SEIBEL, 2005; SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

2.10 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELAÇÃO ÓSSEA

Marcadores de remodelação óssea são testes de laboratório que medem enzimas sintetizadas por osteoblastos ou osteoclastos, ou produtos gerados durante a formação ou a degradação da matriz óssea e liberados para a circulação. A sua determinação no sangue e na

urina fornece uma análise dinâmica e global do esqueleto que complementa a medição estática da densidade mineral óssea e identifica mudanças na remodelação óssea em intervalos de curto prazo (GARNERO; DELMAS, 1998).

Embora os marcadores disponíveis atualmente de remodelação óssea incluem enzimas e peptídeos não enzimáticos derivados de compartimentos celulares e não celulares do osso, eles são geralmente classificados de acordo com o processo metabólico. A maior parte dos índices bioquímicos de reabsorção óssea está relacionada a produtos de degradação de colágeno tais como hidroxiprolina ou as várias ligações cruzadas de colágeno e telopeptídeos. Outros marcadores de reabsorção óssea incluem proteínas de matriz não-colagenosa, tais como sialoproteína óssea ou enzimas específicas dos osteoclastos, fosfatase ácida tartarato-resistente ou catepsina K. Em contraste, marcadores de formação do osso são subprodutos da neossíntese do colágeno (propeptídeos do colágeno tipo I), ou proteínas relacionadas com osteoblastos tais como osteocalcina (OC) e fosfatase alcalina (AP). Para fins clínicos, por conseguinte, os marcadores de formação óssea distinguem-se dos índices de reabsorção óssea (SEIBEL, 2005).

Os marcadores de formação óssea refletem a atividade osteoblástica, estando associados a diferentes estágios de diferenciação e maturação dos osteoblastos. Assim, fosfatase alcalina óssea e pró-peptídeos do procolágeno tipo I são marcadores de início dos osteoblastos, enquanto osteocalcina são marcadores de osteoblastos maduros. Já os marcadores de reabsorção óssea incluem a fosfatase ácida resistente ao tartarato 5b e os marcadores relacionados com o colágeno. Estes refletem a atividades dos osteoclastos através da avaliação dos produtos de degradação do colágeno tipo I e proteínas não colagenosas (Tabela 4).

Tabela 4. Marcadores bioquímicos de remodelação óssea.

Marcadores	Amostra
Formação	
Fosfatase alcalina total	Sangue
Fosfatase alcalina óssea	Sangue
Osteocalcina	Sangue
Pró-peptídeos aminoterminais do procolágeno tipo I (PINP)	Sangue
Pró-peptídeos carboxiterminais do procolágeno tipo I (PICP)	Sangue
Reabsorção	
Fosfatase ácida resistente ao tartarato 5b (TRAP 5b)	Sangue
Piridinolina	Urina
Desoxipiridinolina	Urina
Telo-peptídeos aminoterminais do colágeno tipo I (NTX)	Urina
Telo-peptídeos carboxiterminais do colágeno tipo I (CTX)	Urina, sangue

Fonte: Guañabens, Peris e Monegal (2015).

Os marcadores mais sensíveis para avaliação da formação óssea em mulheres com osteoporose pós-menopausa são a fosfatase alcalina total, a osteocalcina e pró-peptídeos aminoterminais do procolágeno tipo I (PINP). Enquanto NTX e CTX são testes sensíveis entre os marcadores de reabsorção óssea. Atualmente alguns especialistas consideram a fosfatase alcalina óssea, pró-peptídeos aminoterminais do procolágeno tipo I (PINP) e CTX para serem os marcadores de avaliação da osteoporose, porém outros, em vez de CTX, preferem a medição de pró-peptídeos aminoterminais do procolágeno tipo I (PINP) e NTX na prática clínica (GUAÑABENS; PERIS; MONEGAL, 2015).

2.10.1 Osteocalcina

Osteocalcina (OC) é a proteína não colágena mais abundante no osso e dentina, possui 49 aminoácidos e, embora sua função específica não seja conhecida, sabe-se que é sintetizada predominantemente pelos osteoblastos diferenciados, incorporada à matriz óssea extracelular e relacionada à mineralização da matriz osteóide. Seu gene, codificado no cromossoma 1 (1q25-q31) sofre influência direta da 1,25 di-hidroxitamina D₃, que estimula sua síntese. A vitamina K₁ é um co-fator essencial para que ocorra γ -carboxilação pós-traducional do resíduo glutamyl, originando os resíduos γ -carboxiglutamyl. Possui em sua estrutura três ácidos glutâmicos que

lhe conferem a capacidade de ligar-se ao cálcio e isto pode ser importante no processo de mineralização da matriz óssea já formada (LEE; HODGES; EASTELL, 2000).

Uma fração (10 a 40%) da OC intacta recém sintetizada é liberada na circulação, possuindo uma meia-vida curta pois é rapidamente hidrolisada no fígado e eliminada pelos rins. Os fragmentos carboxiterminais são clareados do sangue, onde permanecem os fragmentos aminoterminais intermediários (20-49aa), sendo esta forma juntamente com a intacta as mais abundantes na circulação. Osteocalcina no sangue reflete a atividade dos osteoblastos medindo a fração de OC recém sintetizada liberada para a circulação (LEE; HODGES; EASTELL, 2000).

Podem ser mensuradas por imunoenaios comercialmente disponíveis e específicos para a forma intacta e/ou fragmentos, com grande variabilidade de resultados quando aplicados a um mesmo paciente. A molécula intacta representa cerca de um terço da imunoreatividade no sangue, outra parte está representada por vários fragmentos pequenos e outro terço por um grande fragmento. Isto pode conduzir a resultados conflitantes, dependendo do método utilizado para a sua determinação. Considera-se que o melhor ensaio é o que reflete os níveis circulantes de OC na forma intacta e fragmentos. A OC também é bastante instável *in vitro*, sendo rapidamente degradada em temperatura ambiente. Por este motivo, considera-se um dos marcadores mais difíceis de manusear (LEE; HODGES; EASTELL, 2000; LOMBARDI et al., 2012; GUARNERO; DELMAS, 1998).

Garnero e Delmas (1998) descreveram degradação de 17% em amostras de sangue mantidas a temperatura ambiente por 2h, e é provável que esta degradação ocorra também durante o ensaio. Por isso é recomendado que as amostras sejam mantidas a 4°C imediatamente após a venopuntura até a separação, e o soro ou plasma deve ser congelado até a dosagem (LEE; HODGES; EASTELL, 2000).

Sua liberação respeita um ritmo circadiano com acrófase (momento de pico do sono) às 4 horas e nadir (seu ponto mais baixo) às 17 horas. Possivelmente há influência do ritmo de secreção de cortisol. Entre o pico e nadir, a diferença é de aproximadamente 15%. Além do ritmo circadiano, a interpretação dos resultados deve levar em conta alterações sazonais, dos ciclos menstruais, carga genética (que pode ser responsável por até 40% da variação deste marcador), metodologia empregada e condições de coleta (HESHMATI et al., 1998).

2.10.2 Telopectídeos aminoterminais do colágeno tipo I

As moléculas interligadoras do colágeno tipo I são atualmente os melhores marcadores bioquímicos da reabsorção óssea e, portanto, são os mais utilizados mostrando boa correlação com estudos histomorfométricos (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

Uma molécula de colágeno tipo I é composta por três cadeias de aminoácidos que formam uma hélice tripla e extensões não helicoidais triplas em que os grupos amino carboxi e terminais das extremidades são chamados de telopeptídeos N e C do colágeno do tipo I. Estes fragmentos das extremidades da molécula de colágeno são peptídeos liberados no sangue como produtos da degradação quando o osso é reabsorvido e contém pontes piridinolina e deoxipiridinolina. Ambos os marcadores de colágeno tipo I são liberados pela hidrólise osteoclástica, gerados principalmente pela catepsina K (KWANSA; VITA; FREEMAN, 2014).

Nas últimas décadas, telopeptídeos do colágeno tipo I tornaram-se os marcadores de reabsorção óssea mais utilizados. Além disso, a Fundação Internacional de Osteoporose recomenda usar CTX no sangue como marcador para reabsorção óssea (VASIKARAN et al., 2011). No entanto, estudos recentes têm demonstrado que a excreção urinária de NTX pode ser muito útil na prática clínica (BAXTER et al., 2013).

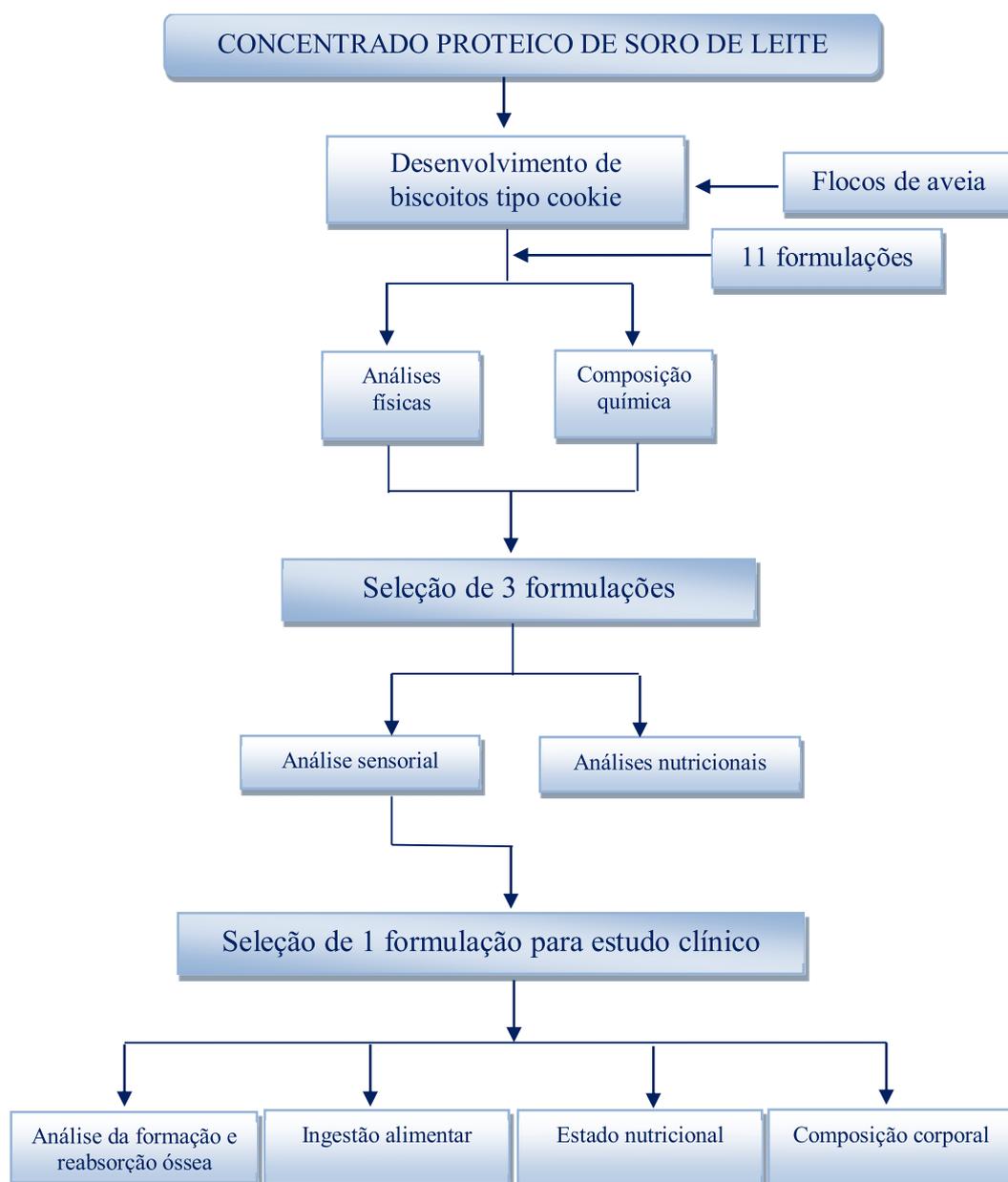
Ao contrário das piridinolinas livres, a avaliação dos telopeptídeos do colágeno tipo I parecem mostrar maior correlação com a dinâmica do osso. Podem ser dosados no sangue e na urina, sendo que uma série de ensaios diferentes existem, o que muitas vezes dificulta sua solicitação e interpretação pelo clínico. Na urina podem ser dosadas as formas livres de piridinolinas e deoxipiridinolinas, e as formas ainda ligadas a telopeptídeos aminoterminais e carboxiterminais do colágeno tipo I (NTX e CTX, respectivamente) (DELMAS et al., 2000).

Como descrito para OC, os marcadores de reabsorção presentes na urina também mostram um ritmo circadiano com pico pela manhã e nadir ao entardecer. A diferença de aproximadamente 100% dos valores entre estes dois pontos mostra a importância da padronização de coleta (pela manhã). Não sofrem, entretanto, influência da dieta (GARNERO; DELMAS, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 8 apresenta o fluxograma das atividades experimentais.

Figura 8. Fluxograma das atividades experimentais.



Fonte: Elaborado pelo autor (2016).

3.1 CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE (CPS)

O CPS foi fornecido pelo Laboratório de Operações Unitárias do Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) da Universidade de Passo Fundo, através do projeto “Valoração de soro de leite através de processos de filtração por membranas e bioprocessos”, desenvolvido pelo Professor Coordenador Dr. Vandré Barbosa Brião.

A caracterização deste CPS, fornecida pelo Laboratório de Operações Unitárias, é de 89,95% de proteínas, 5,98% de gordura e 2,15% de cinzas. Entre os minerais, possui 1294 mg de sódio, 2879 mg de potássio, 330 mg de magnésio, 1108 mg de cálcio e 417 mg de fósforo.

3.2 APLICAÇÃO DO CPS EM BISCOITOS TIPO COOKIES

3.2.1 Delineamento experimental

A análise do efeito combinado das variáveis individuais sobre as características tecnológicas dos biscoitos foi realizada utilizando-se um delineamento experimental composto rotacional, envolvendo duas variáveis independentes (CPS e aveia). A Tabela 5 apresenta os níveis das variáveis independentes, compreendendo os pontos inferior (-1), superior (+1), central (0) e axiais ($+\alpha$ e $-\alpha$). Ensaios preliminares foram realizados para definição do ponto central, antes da aplicação do delineamento experimental.

A matriz do delineamento experimental que foi aplicada está apresentada na Tabela 6. Serão realizados 11 ensaios, sendo quatro fatoriais (combinações dos níveis -1 e +1), quatro axiais ($+\alpha$ e $-\alpha$) e três repetições no ponto central (0).

Paralelamente aos ensaios, segundo o delineamento experimental descrito, foram produzidos biscoitos com a formulação controle, sem adição de CPS e aveia, para comparação de algumas das propriedades dos biscoitos.

Tabela 5. Variáveis e níveis do delineamento experimental.

Variável independente	Nível de variação				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
CPS (%)	0,0	8,8	15	21,2	30,0
Flocos de aveia (%)	0,0	11,7	20	28,3	40,0

Tabela 6. Delineamento experimental composto rotacional para duas variáveis e dois níveis.

Formulações	Codificada		Real	
	X ₁	X ₂	Aveia (%)	CPS (%)
1	-1	-1	5,9	4,4
2	1	-1	34,1	4,4
3	-1	1	5,9	25,6
4	1	1	34,1	25,6
5	- α	0	0	15
6	+ α	0	40	15
7	0	- α	20	0
8	0	+ α	20	30
9	0	0	20	15
10	0	0	20	15
11	0	0	20	15

$\alpha = 1,414$ para $K = 2$ (duas variáveis independentes)

3.2.2 Formulação dos biscoitos tipo cookie

Os biscoitos foram elaborados de acordo com o método nº 10-50.05 da American Association of Cereal Chemists-AACC (2010) (Tabela 7). Foram feitas adaptações nas quantidades dos ingredientes açúcar, gordura, fermento e adicionado essência de limão. Os ingredientes CPS e aveia foram adicionados em substituição parcial a farinha de trigo, conforme delineamento experimental (Tabela 8).

Os biscoitos foram produzidos no Laboratório de Panificação do CEPA da Universidade de Passo Fundo (UPF). A gordura hidrogenada, o açúcar, o sal e o fermento químico em pó foram misturados em batedeira elétrica marca Kitchen Aid por três minutos em baixa velocidade e com pausas a cada minuto, para raspagem das paredes do recipiente. A seguir, nesse mesmo recipiente, foram adicionadas água destilada, solução de dextrose e essa massa foi misturada em baixa velocidade por um minuto e à média velocidade por um minuto. Após este processo, adicionou-se a farinha de trigo, os flocos de aveia e o CPS, essa massa foi misturada por dois a baixa velocidade, raspando a parede após cada meio minuto. A mistura pronta foi dividida em porções, laminada na espessura de 13 mm e cortada utilizando matriz de aço inoxidável de 60 mm de diâmetro. Os discos de circunferência uniforme foram pesados e assados a 204 °C por 10 min. Para cada amostra foram produzidas seis unidades de biscoitos

tipo cookie, que foram pesados após uma hora, acondicionados em recipientes e fechados hermeticamente.

Tabela 7. Formulação padrão dos biscoitos tipo cookie.

Ingredientes (g)	Quantidade
Farinha de trigo	225,5
Açúcar refinado	130,0
Sal	2,1
Gordura vegetal	64,0
Fermento químico	2,5
Solução de dextrose*	32,8
Água destilada*	15,5

* Valores em mL.

Tabela 8. Formulação adaptada com adição de CPS e flocos de aveia.

Ingredientes (g)	Formulações									
	1	2	3	4	5	6	7	8	PC*	12**
Farinha de trigo	201,8	138,2	154,0	90,4	191,2	101,0	179,9	112,3	146,1	225,5
CPS	9,9	9,9	57,7	57,7	33,8	33,8	0,0	67,7	33,8	-
Flocos de aveia	13,3	76,9	13,3	76,9	0,0	90,2	45,1	45,1	45,1	-
Açúcar	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5	97,5
Sal	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
Gordura	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
Solução de dextrose (mL)	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8
Fermento	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Água (mL)	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5
Essência	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

* PC = ponto central (ensaios 9, 10 e 11); ** Formulação padrão (controle)

3.2.3 Análises físico-químicas

3.2.3.1 *Peso, diâmetro, espessura*

Para a determinação dos parâmetros de peso, diâmetro e espessura foram seguidos os procedimentos conforme descrito no método 10-50.05 da AACC (2010). A perda de peso dos biscoitos foi obtida pela variação de peso, antes e após o cozimento. Quanto ao diâmetro e a espessura, estes foram determinados com paquímetro.

3.2.3.2 *Fator de expansão*

O fator de expansão foi obtido pela razão entre os valores de diâmetro e espessura dos biscoitos, corrigidos pela altitude e pressão barométrica ao nível do mar, conforme método 10-50.05 da AACC (2010).

3.2.3.3 *Volume específico*

O volume foi determinado pelo método de deslocamento de sementes de painço e o volume específico calculado pela relação entre o volume dos biscoitos assados e a sua massa, obtida por pesagem em balança semi-analítica. A determinação do volume específico foi realizada 24 h após o cozimento dos biscoitos, com três repetições e os resultados expressos em $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$.

3.2.3.4 *Cor*

A cor foi determinada pelo emprego do equipamento Espectrofotômetro de Reflectância Difusa (Hunter Lab), modelo Color Quest II, com sensor ótico geométrico de esfera. O aparelho foi calibrado com cerâmica, realizando-se a leitura por reflexão e utilizando-se ângulo de observação de 10° , geometria e iluminante D65. No sistema Hunter de cor, corrigido pelo sistema de avaliação CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage* ou Comissão Internacional de Iluminação), os valores L^* (luminosidade) variam entre zero (preto) e 100 (branco), $-a^*$ (verde) até $+a^*$ (vermelho), e $-b^*$ (azul) a $+b^*$ (amarelo). As leituras foram realizadas em triplicata.

3.2.3.5 Textura

A textura do biscoito foi determinada através de um analisador de textura (modelo TA.XTplus, Stable Micro Systems, Reino Unido), equipado com software Exponent 32, utilizando o probe HDP/3PB e plataforma HPD/90. Os parâmetros avaliados foram dureza (força máxima) e fraturabilidade (distância de ruptura).

3.2.3.6 Composição química

Os teores de umidade, lipídios e cinzas foram determinados de acordo com os métodos nº 12, 32 e 18 do Instituto Adolfo Lutz, respectivamente (IAL, 2008). A proteína bruta foi determinada segundo a ISO 1871 (2009). Os teores de fibra alimentar total foram determinados pelo método nº 991.43 da AOAC (2007). Os carboidratos totais foram calculados por diferença, incluindo a fração fibra alimentar, segundo Brasil (2003), através da Equação 1: $E = 100 - (A+B+C+D)$, onde A = Proteína B = Gordura C = Umidade D = Cinzas E = Carboidratos e valor calórico determinado conforme a Equação 2: Valor Calórico (cal) = (Proteína x 4) + (Carboidrato x 4) + (Gordura x 9). As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em porcentagem. Os valores de proteína bruta, lipídios, cinzas, fibra alimentar total e carboidratos foram expressos em base seca. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Físico-Química e no Laboratório de aulas práticas do Centro de Pesquisa em Alimentação da Universidade de Passo Fundo.

3.2.4 Análise nutricional dos biscoitos

3.2.4.1 Determinação e quantificação de ácidos graxos

As análises foram realizadas através de cromatografia gasosa, de acordo com o método nº 1f-96 da AOCS (2002). As amostras foram submetidas à digestão ácida e os lipídios foram extraídos com hexano de acordo com o método nº 32 (IAL, 2008). Este processo foi seguido de esterificação da gordura, ou seja, metilação para produção de ésteres metílicos, através do método de Metcalfe et al. (1976) e Hartman e Lago (1973), adaptado e validado no Laboratório de Cromatografia do CEPA. Após as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa, em cromatógrafo modelo GCMS-TQ 8030. Foram definidos teores totais de: ácidos graxos *trans*,

diferentes tipos de isômeros *trans*, lipídios saturados, monoinsaturados e poliinsaturados. Esses valores foram apresentados por 100 gramas de cada amostra analisada.

3.2.4.2 *Determinação e quantificação de minerais*

As concentrações de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) e dos elementos traços, ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn) foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica utilizando espectrofotômetro Perkin-Elmer Analyst 300. Óxido de lantânio foi adicionado às soluções ácidas das cinzas e às soluções padrão em proporção final de 1% (m/v) para evitar possíveis interferências na determinação de Ca e Mg. Potássio (K), sódio (Na) e fósforo (P) foram determinados por fotometria de chama (B262 Micronal) com escala de leitura de 0 a 150 mg/L. Teores de minerais foram determinados de acordo com o método 985.35 descrito pela AOAC (2005). Os minerais foram quantificados a partir de soluções padrão de concentrações conhecidas.

3.2.4.3 *Determinação e quantificação de aminoácidos*

Os aminoácidos totais foram determinados por HPLC, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência de ultra-violeta (HPLC-DAD/UV), antecedida de hidrólise, derivatização e injeção automatizadas.

3.2.4.4 *Digestibilidade in vitro de proteínas*

A digestibilidade da proteína deve ser entendida como sendo a porção da proteína que pode ser hidrolisada pelas enzimas digestivas até aminoácidos e que, portanto, estaria disponível biologicamente, desde que não houvesse nenhuma interferência na absorção dos aminoácidos pelo organismo humano. A digestibilidade das proteínas foi determinada pelo método de Akeson e Stahmann (1964), através da avaliação *in vitro* da taxa de hidrólise por associações enzimáticas de pepsina e pancreatina, simulando as condições existentes no trato gastrointestinal.

3.2.4.5 Determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS)

Para o cálculo do escore químico e do PDCAAS, os valores do conteúdo de aminoácidos foram expressos em mg de aminoácido por grama de proteína e comparados com a recomendação da DRIs para crianças pré-escolares de 1 a 3 anos, padrão usado porque ultrapassa os valores de necessidades de aminoácidos de crianças maiores e adultos (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2005). Para o cálculo do PDCAAS, tomou-se por base o valor do escore químico do aminoácido essencial mais limitante. Calculou-se o PDCAAS multiplicando-se o escore mais baixo de aminoácido essencial pela digestibilidade da proteína. Para resultado de PDCAAS igual ou superior a 1,0 foi considerada proteína de boa qualidade.

3.2.5 Análise sensorial

As formulações dos biscoitos que foram utilizadas para a realização dos testes sensoriais foram selecionadas através dos resultados das análises físicas e químicas, sendo utilizadas as 3 amostras com os melhores resultados.

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Seres Humanos da Universidade de Passo Fundo (Parecer nº 1.088.511 – Anexo A) e todos os consumidores assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes da participação (Apêndice C).

O critério de inclusão para o recrutamento do grupo para os testes sensoriais de ordenação preferência e aceitabilidade global foi definido como: homens e mulheres com idade superior a 18 anos e inferior a 60 anos, que não apresentassem diabetes e nenhuma alergia a algum ingrediente utilizado na formulação dos biscoitos, além da intenção de consumo de biscoitos enriquecidos com CPS e aveia.

O recrutamento dos consumidores foi realizado com funcionários, professores e alunos da Universidade de Passo Fundo, além de pessoas da comunidade em geral. Foram selecionados de acordo com a vontade em participar de forma voluntária, com base no interesse, disponibilidade de horário e vontade de avaliar os biscoitos no dia marcado para o teste sensorial.

Um questionário auto-preenchido com questões semi-estruturadas foi desenvolvido (Apêndice E). O questionário incluía questões relacionadas às características socioeconômicas e demográficas (idade, sexo, raça/cor, estado civil e educação) e frequência de consumo de

biscoitos. O questionário foi utilizado para estabelecer correlações com os dados dos testes sensoriais.

O experimento foi conduzido no mês de agosto de 2015. Os testes de consumidor foram realizados de acordo com os métodos descritos por Meilgaard, Civille e Carr (2007) para avaliar a preferência, aceitabilidade e intenção de compra de amostras de biscoitos enriquecidos com CPS e aveia.

Os testes de consumidores foram realizados em um único encontro, porém dois protocolos foram preenchidos, sendo um com o teste de ordenação preferência e outro com os testes de aceitabilidade e intenção de compra.

No primeiro protocolo, os biscoitos foram avaliados através de teste ordenação preferência. As 3 amostras foram oferecidas ao mesmo tempo. O objetivo desse teste foi avaliar a preferência de consumidores de acordo com a incorporação de CPS e aveia. A ordem de apresentação das amostras foi determinada através de delineamento experimental de blocos completos balanceados. As amostras foram apresentadas em pratos plásticos brancos e identificadas com códigos de três dígitos. Após explicação oral das regras do teste ordenação preferência, os consumidores avaliaram a preferência entre três amostras de biscoitos contendo diferentes níveis de CPS e aveia, utilizando nota 1 (amostra mais preferida) a 3 (amostra menos preferida), baseados na impressão global (Apêndice F). Água mineral foi distribuída aos participantes para a limpeza do palato.

Após o teste de ordenação preferência, os mesmos consumidores participaram dos testes sensoriais de aceitabilidade e intenção de compra das mesmas 3 amostras de biscoito oferecidas no teste anterior. A avaliação da aceitabilidade foi realizada com o emprego de escala hedônica estruturada de 9 pontos, ancorada nos extremos “1 – desgostei muitíssimo” e “9 - gostei muitíssimo”. Os atributos avaliados foram aparência, sabor, aroma e textura, além da nota global do produto. Para a intenção de compra, foi utilizada a escala de atitude de cinco pontos. As categorias de respostas variaram de “1 – certamente eu não compraria” a “5 – certamente eu compraria” (Apêndice G).

3.3 ESTUDO CLÍNICO

Foi realizado um estudo intervencional, com ensaio clínico, longitudinal, prospectivo, não controlado. O recrutamento das pessoas foi realizado através de convite à alunos, funcionários e professores da Universidade de Passo Fundo. Foram selecionados de acordo com

a vontade em participar de forma voluntária, com base no interesse, vontade de consumir o biscoito por 16 dias e fazer as análises determinadas no estudo.

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Seres Humanos da Universidade de Passo Fundo (Parecer nº1.088.511 – Anexo A) e todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes da participação (Apêndice D).

O critério de inclusão para o recrutamento do grupo para o estudo clínico foi definido como: mulheres com idade igual ou superior a 20 e inferior a 50 anos, que não apresentassem diabetes, intolerância à lactose e nenhuma alergia a algum ingrediente utilizado na formulação dos biscoitos. Esta faixa de idade foi estabelecida por ser definida como idade adulta, onde o metabolismo ósseo está em equilíbrio, com reabsorção seguida de formação em ciclos constantes, de modo que a quantidade de osso removido é sempre igual à quantidade de osso recentemente formado (SEIBEL, 2005). Foram coletados dados socioeconômicos e demográficos das participantes do estudo (Apêndice H).

3.3.1 Inclusão do biscoito na dieta

A formulação de biscoito utilizada para este estudo foi definida pelo resultado do teste de ordenação preferência da análise sensorial, sendo a mais preferida a formulação do ponto central, contendo 15% de CPS e 20% de aveia.

O número de dias de ingestão do biscoito na dieta habitual se baseou no estudo realizado por Toba et al. (2001), que utilizou isolado proteico de soro de leite como suplemento por 16 dias em homens adultos.

Foram oferecidos 4 biscoitos ao dia em embalagem plástica, vedada e identificada com as respectivas datas de consumo (Figura 9). A quantidade de biscoito disponibilizada para ingestão por dia foi determinada após análise da quantidade de proteína da formulação por composição centesimal. Cada biscoito continha 0,66 gramas de proteína, totalizando 2,64 gramas ao dia. O consumo do biscoito iniciou no dia 18/10/15, sendo ingerido diariamente até 02/11/15, sem interrupções.

Figura 9. Biscoitos embalados e identificados para consumo. Passo Fundo/RS, 2016.



Fonte: Acervo do autor (2016).

3.3.2 Composição corporal

A determinação da composição corporal foi feita por bioimpedância elétrica (BIA). A BIA foi realizada em aparelho BIODYNAMICS, modelo 310e, conforme recomendações do fabricante. Essa metodologia envolve a passagem de uma corrente elétrica de baixa amplitude (500 a 800 μA) e alta frequência (50kHz) onde, a massa muscular magra e a água corpórea total são condutores e a gordura corpórea oferece resistência à passagem dessa corrente elétrica, sendo mensurados resistência, reactância, impedância e ângulo de fase (FOSTER; LUKASKY, 1996). O exame de BIA foi realizado antes do início da ingestão do biscoito e depois de findar os 16 dias, sendo realizado no Laboratório da Avaliação Nutricional do Curso de Nutrição da Universidade de Passo Fundo.

3.3.3 Antropometria e estado nutricional

Para avaliação do estado nutricional foram coletadas medidas de peso, altura e circunferência da cintura. A medida do peso foi realizada em balança digital, marca Welmy, com capacidade máxima de 300kg e mínima de 1kg. Os participantes foram orientados a vestirem roupas leves e estarem descalços. A aferição da altura foi realizada em estadiômetro vertical. A circunferência da cintura foi realizada com fita métrica não extensível. A técnica adotada para a coleta das medidas foi baseada nas recomendações propostas pelo Ministério da Saúde para adultos (BRASIL, 2011).

O estado nutricional foi determinado pelo cálculo do índice de massa corporal (IMC) que é a relação entre o peso e o quadrado da altura (kg/m^2), segundo classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Os pontos de corte estabelecidos são: baixo peso IMC $<18,5 \text{ kg}/\text{m}^2$, peso adequado IMC $\geq 18,5$ a $<25 \text{ kg}/\text{m}^2$, sobrepeso IMC ≥ 25 a $<30 \text{ kg}/\text{m}^2$ e obesidade IMC $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$ (WHO, 1995).

Outro parâmetro que foi utilizado para avaliar o estado nutricional foi a circunferência da cintura (CC). Este indicador afere a localização da gordura corporal. Em adultos, o padrão de distribuição do tecido adiposo tem relação direta com o risco de morbi-mortalidade. Os parâmetros de classificação da CC foram os propostos pela OMS, seguindo os seguintes critérios para risco de desenvolvimento de doenças: $\geq 80,0$ cm para homens e $\geq 94,0$ cm para mulheres (WHO, 2000).

As medidas de peso, altura e circunferência da cintura foram realizadas no Laboratório da Avaliação Nutricional do Curso de Nutrição da Universidade de Passo Fundo, antes do início da ingestão do biscoito e depois de findar os 16 dias.

3.3.4 Ingestão alimentar

A ingestão de proteína e de cálcio foi estimada através de autoregistro alimentar estimado. Neste inquérito, as participantes foram orientadas a preencher três autoregistros com o horário, modo de preparo e a quantidade dos alimentos consumidos em cada refeição, de modo que um dia pertencente ao final de semana e dois durante a semana, antes do início do consumo do biscoito.

As quantidades ingeridas foram estimadas em medidas caseiras pelas participantes e depois convertidas em gramas para análise. A média de proteína ingerida foi expressa em

gramas por dia (g/dia) e de cálcio foi expressa em miligramas por dia (mg/dia). A análise dos autoregistros alimentares foi realizada por meio do *software* de Nutrição Dietwin®.

3.3.5 Análise da formação óssea

A formação óssea foi determinada através do marcador bioquímico osteocalcina. O método utilizado foi eletroquimioluminescência através de plasma congelado. Foram feitas coletas de sangue antes e após a ingestão do biscoito. As coletas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas Escola (LABE), do Curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo e foram enviadas para análise no Laboratório Diagnósticos do Brasil de Curitiba, PR.

3.3.6 Análise da reabsorção óssea

A reabsorção óssea foi determinada pelo marcador bioquímico telopeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I (NTX). O método utilizado para análise do telopeptídeo aminoterminal do colágeno tipo I na urina foi enzimaímunoensaio. É uma técnica de imunoensaio ligado à enzima de inibição competitiva (ELISA) que se utiliza de um anticorpo monoclonal dirigido contra a sequência que inclui os NTX isolados na urina. Este anticorpo monoclonal não reconhece os interligados livres presentes na urina (piridinolinas livres).

A coleta de urina foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas Escola (LABE), do Curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo e a análise do NTX foi realizada pelo Laboratório Diagnósticos do Brasil de Curitiba, PR. Foram feitas coletas de urina antes e após a ingestão do biscoito.

3.3.7 Doseamento de cálcio

Para análise do cálcio no plasma e na urina foi utilizado o método direto CPC, com o reagente CÁLCIO Liquiform, sistema Labtest. A coleta e análise de sangue e urina foi feita Laboratório de Análises Clínicas Escola (LABE), do Curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo, também antes e após a ingestão do biscoito.

3.4 TRATAMENTO DOS DADOS

Para o tratamento dos dados das análises físicas e químicas das diferentes formulações dos biscoitos, utilizou-se a metodologia de superfície de resposta. Esta técnica descreve o comportamento da variável dependente (y) frente às mudanças nas variáveis independentes (x_k) dentro do intervalo estudado (BOX; DRAPER, 1987). A significância do modelo foi testada pela análise de variância (teste F). Nos modelos ajustados foram eliminadas as variáveis não significativas permanecendo na equação final somente aquelas significativas ao nível de 5 % de probabilidade.

Os resultados dos testes de análise sensorial foram analisados pelo teste não paramétrico de Friedman e os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Para os resultados das análises nutricionais, realizou-se análise de variância. O teste de Tukey para comparação entre médias foi utilizado para determinar as diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Para a análise dos resultados do estudo clínico, aplicou-se o teste de Wilcoxon para as variáveis não paramétricas e o teste t pareado para as variáveis paramétricas. O coeficiente de correlação entre a excreção urinária NTX e a concentração no sangue de osteocalcina foi testado com uma análise de regressão linear, diferenças sendo consideradas significantes se $p < 0,05$.

As análises estatísticas foram realizadas através dos *softwares* *Statistica* versão 8.0 e SPSS versão 16.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BISCOITO TIPO COOKIE

4.1.1 Desenvolvimento dos biscoitos tipo cookie

Foram desenvolvidas 11 formulações de biscoitos com diferentes concentrações de CPS e aveia, segundo delineamento experimental. Também utilizou-se a formulação padrão (sem adição de CPS e aveia) para comparação em algumas análises. Nas Figuras 10, 11 e 12 estão apresentadas as 11 formulações de biscoitos desenvolvidas.

Figura 10. Biscoitos das formulações 1, 2, 3 e 4.



Da esquerda para a direita: F1: 4,4% CPS/5,9%aveia; F2: 4,4% CPS/34,1% aveia; F3: 25,6% CPS/5,9% aveia; F4:25,6% CPS/34,1% aveia

Figura 11. Biscoitos das formulações 5, 6, 7 e 8.



Da esquerda para a direita: F5: 15% CPS/0,0% aveia; F6: 15% CPS/40% aveia; F7: 0% CPS/20% aveia; F8: 30% CPS/20% aveia

Figura 12. Biscoitos das formulações do ponto central.



Formulações do ponto central com 15% CPS/20% aveia. Da esquerda para a direita F9, F10 e F11.

As Figuras 10, 11 e 12 mostram as diferentes apresentações físicas obtidas em função das formulações desenvolvidas conforme delineamento mostrado na Figura 6.

4.1.2 Avaliação tecnológica dos biscoitos

4.1.2.1 Avaliação física dos biscoitos

A Tabela 9 apresenta as avaliações físicas dos biscoitos, como perda de peso, diâmetro, espessura, fator de expansão e volume específico.

Tabela 9. Respostas da avaliação tecnológica de biscoitos utilizando planejamento fatorial 2^2 para perda de peso, diâmetro, espessura, fator de expansão e volume específico

Ensaio	X₁	X₂	PP (g)	D (mm)	ESP (mm)	FE	VE (mL.g⁻¹)
1	5,9	4,4	3,33±0,06	82,08±0,76	73,59±0,37	1,12±0,01	2,30±0,06
2	34,1	4,4	3,80±0,00	86,24±0,42	62,68±0,46	1,38±0,01	2,43±0,15
3	5,9	25,6	2,70±0,00	73,68±0,72	89,27±0,42	0,83±0,01	1,87±0,05
4	34,1	25,6	2,53±0,06	71,53±0,61	90,74±0,38	0,79±0,01	1,92±0,01
5	0	15	3,30±0,00	76,80±0,37	82,56±0,45	0,93±0,00	2,14±0,03
6	40	15	3,50±0,10	86,17±0,87	62,49±0,52	1,38±0,02	2,24±0,02
7	20	0	3,27±0,06	81,22±0,90	63,25±0,62	1,28±0,00	1,76±0,09
8	20	30	2,60±0,00	69,85±1,11	92,48±0,28	0,76±0,01	1,73±0,03
9	20	15	3,44±0,12	82,03±2,10	71,66±0,67	1,14±0,03	2,41±0,01
10	20	15	3,38±0,03	83,55±0,89	72,44±0,78	1,15±0,01	2,40±0,05
11	20	15	3,30±0,05	82,99±0,77	72,44±0,76	1,15±0,01	2,40±0,07

x₁ = concentração de flocos de aveia (%); x₂ = concentração de CPS (%); PP = perda de peso; D = diâmetro; ESP = espessura; FE = fator de expansão; VE = volume específico.

Valores médios ± DP de determinações em triplicata.

Durante o processo de cozimento, a massa predominantemente viscoelástica é transformada em um produto cozido sólido. Neste processo são determinadas as propriedades físicas do produto final, incluindo dimensões (diâmetro e espessura) e peso do biscoito. Estas alterações são determinadas pelo desenvolvimento da estrutura porosa durante o cozimento. A redução do peso do biscoito ocasionada pelo cozimento é conhecida como perda de peso. A relação entre o aumento do diâmetro e a espessura após o cozimento corresponde ao fator de expansão (CRONIN; PREIS, 2000).

A Tabela 10 apresenta a estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) na perda de peso dos biscoitos (g), ao nível de 95% de confiança.

Tabela 10. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) na perda de peso dos biscoitos (g), ao nível de 95% de confiança

Fator	Efeitos	p
Média	3,373	<0,001
Flocos de aveia (%) (L)	0,146	0,264
Flocos de aveia (%) (Q)	-0,009	0,948
CPS (%) (L)	-0,712	0,002
CPS (%) (Q)	-0,479	0,018
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	-0,317	0,111

L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

Observa-se que a variável independente CPS apresentou efeito linear significativo ($p < 0,05$) sobre a perda de peso dos biscoitos, o que indica que este fator tem maior influência na perda de peso. Quanto maior a concentração de CPS nos biscoitos, menor é a perda de peso, isto significa que, aumentando a concentração de CPS de 4,4% para 25,6%, diminui a perda de peso em 0,71g. A variação da perda de peso foi provavelmente devido às diferenças na concentração de proteínas, pela capacidade de absorção de água. Neste trabalho, o aumento na concentração de flocos de aveia não afetou a perda de peso dos biscoitos, comportamento também encontrado por Assis et al. (2009) e Mauro, Silva e Freitas (2010). Porém, em virtude das características hidrofílicas da fibra, que geralmente retém mais água, esperava-se encontrar resultado diferente, como relatado por Perez e Germani (2007).

De acordo com a análise de variância da regressão (Tabela 11), observou-se que os dados experimentais se ajustaram ao modelo de segunda ordem, visto que $F_{\text{calculado}}$ foi superior ao F_{tabelado} , com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,91. O modelo matemático empírico de 2ª ordem, obtido está apresentado na Equação 1. Considerando que o modelo quadrático foi válido para a variável resposta CPS, o mesmo foi utilizado para gerar a superfície de resposta e confirmar os resultados observados na análise de efeitos estimados (Figura 13).

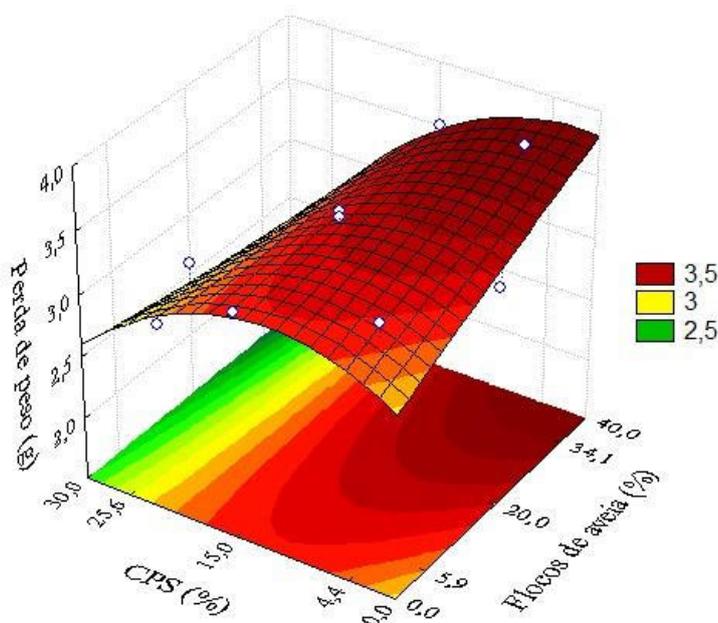
$$\text{Perda de peso (g)} = 3,373 - 0,356\text{CPS} - 0,239\text{CPS}^2 \quad (1)$$

Tabela 11. Análise de variância para perda de peso dos biscoitos

	GL	SQ	QM	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Regressão	5	1,501055	0,300211	11,172644	5,05	0,91785
Resíduo	5	0,134351	0,02687			
Erro	5	0,134351				
Total	10	1,635406				

GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio (QM=SQ/GL); Valor F = teste de Fisher; R² = coeficiente de determinação (%).

Figura 13. Superfície de resposta para perda de peso (g) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%).



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

O fator de expansão é a razão entre o diâmetro e a espessura dos biscoitos e é utilizado para prever sua qualidade (GAINES, 1993). Aqueles com índice de expansão muito elevado ou muito baixo causam problemas na indústria, uma vez que resultam em produtos com tamanho pequeno ou peso muito elevado. A Tabela 12 apresenta a estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) no fator de expansão dos biscoitos (g), ao nível de 95% de confiança.

Tabela 12. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) no fator de expansão dos biscoitos (g), ao nível de 95% de confiança

Fator	Efeitos	p
Média	1,148	<0,001
Flocos de aveia (%) (L)	0,215	0,012
Flocos de aveia (%) (Q)	-0,024	0,731
CPS (%) (L)	-0,407	0,001
CPS (%) (Q)	-0,160	0,060
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	-0,149	0,116

L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

De acordo com a estimativa dos efeitos lineares e quadráticos, observou-se efeito linear significativo ($p < 0,05$) sobre o fator de expansão dos biscoitos para ambas as variáveis. O fator de expansão dos biscoitos aumentou com o acréscimo de flocos de aveia, o que significa que aumentando a concentração de flocos de aveia de 5,9 para 34,1%, tem-se aumento de 0,21 neste fator. Este resultado possivelmente ocorreu devido a presença da fibra insolúvel presente nos flocos de aveia, que pode ter ocasionado maior disponibilidade de água na massa, possibilitando a gelatinização do amido presente na farinha, causando maior expansão dos biscoitos, resultado relatado por Gutkoski et al. (2007).

O aumento na concentração de CPS ocasionou diminuição no fator de expansão, isto significa que, aumentando a concentração de CPS de 4,4 para 25,6%, diminui o fator de expansão em 0,41. Este resultado pode ser explicado pela tendência em tornar a massa mais forte quando da utilização de farinhas adicionadas de fontes proteicas, como o CPS, podendo prejudicar sua extensibilidade em níveis de substituição mais elevados, como obtido por El-Dash e Germani (1994), utilizando farinha de soja.

Kissel, Prentice e Yamazaki (1975), afirmaram que o fenômeno de expansão de biscoitos é primariamente físico e controlado pela capacidade dos componentes de absorver água. Assim, o acréscimo de componentes que possuem maior capacidade de reter água do que a farinha de trigo (como é o caso do CPS) resulta em uma competição pela água livre presente na massa do biscoito, limitando a taxa de expansão.

De acordo com a análise de variância da regressão (Tabela 13), observou-se que os dados experimentais se ajustaram ao modelo de segunda ordem, visto que $F_{\text{calculado}}$ foi superior ao F_{tabelado} , com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,94. O modelo matemático empírico de 2ª ordem, obtido está apresentado na Equação 2. Considerando que o modelo quadrático foi

válido, o mesmo foi utilizado para gerar a superfície de resposta e confirmar os resultados observados na análise de efeitos estimados (Figura 14).

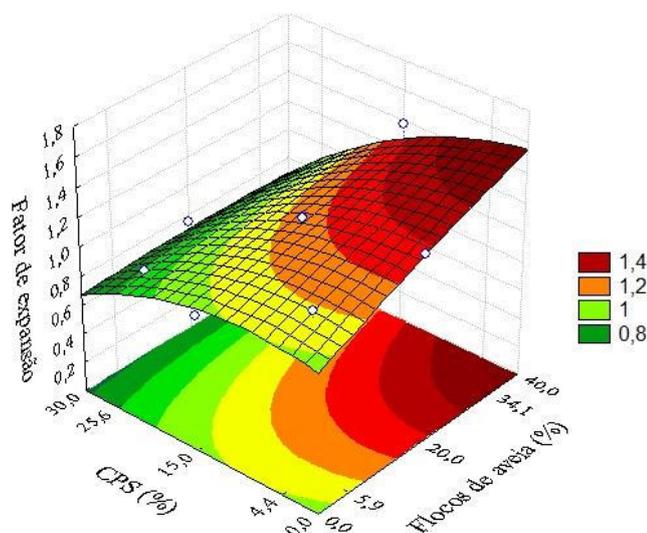
$$\text{Fator de expansão (g)} = 1,148191 + 0,107361\text{Aveia} - 0,203529\text{CPS} \quad (2)$$

Tabela 13. Análise de variância para fator de expansão dos biscoitos

	GL	SQ	QM	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Regressão	5	0,481	0,096	15,703	5,050	0,940
Resíduo	5	0,031	0,006			
Erro	5	0,031				
Total	10	0,512				

GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio (QM=SQ/GL); Valor F = teste de Fisher; R² = coeficiente de determinação (%).

Figura 14. Superfície de resposta para o fator de expansão (g) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%).



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

O volume específico dos biscoitos é calculado pela razão entre o volume do biscoito (mL) e a sua massa (g). Ele é afetado por fatores como a qualidade dos ingredientes usados na formulação da massa, especialmente a farinha e os tratamentos usados durante o processamento (EL DASH; CAMARGO, 1982). A Tabela 14 apresenta a estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) no volume específico dos biscoitos (mL.g⁻¹), ao nível de 95% de confiança.

Tabela 14. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) no volume específico (mL.g⁻¹), ao nível de 95% de confiança

Fator	Efeitos	p
Média	2,400	<0,001
Flocos de aveia %(L)	0,079	0,553
Flocos de aveia %(Q)	-0,126	0,431
CPS %(L)	-0,246	0,103
CPS %(Q)	-0,577	0,011
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	-0,043	0,815

L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

A variável independente CPS apresentou efeito quadrático significativo e negativo ($p < 0,05$) sobre o volume específico dos biscoitos. Este efeito (-0,577) indica que há um ponto de máximo. Porém, observa-se que ambas as variáveis (flocos de aveia e CPS) não apresentaram efeito linear significativo sobre o volume específico dos biscoitos. Sendo assim, pode afirmar que estes fatores não têm influência no volume específico. A média de volume nas diferentes formulações foi de 2,15 cm³.g⁻¹, estando de acordo com os resultados obtidos por Gutkoski et al. (2003), que obtiveram volume específico entre 1,97 e 2,21 cm³.g⁻¹ para biscoitos.

A Tabela 15 apresenta a análise de variância para o volume específico dos biscoitos em relação à adição de flocos de aveia e a adição de CPS nas formulações de biscoitos do delineamento experimental.

Tabela 15. Análise de variância para volume específico nas formulações de biscoito

	Graus de liberdade	Soma quadrático	Média quadrático	F calculado	F tabelado	R²
		a	a			
Regressão	5	0,604	0,121	3,956	5,050	0,798
Resíduo	5	0,153	0,031			
Erro	5	0,153				
Total	10	0,757				

GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio (QM=SQ/GL); Valor F = teste de Fisher; R² = coeficiente de determinação (%).

De acordo com a análise de variância, observou-se que os dados experimentais não se ajustaram ao modelo, visto que $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao F_{tabelado} , com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,798.

4.1.2.2 Cor dos biscoitos

A cor dos biscoitos é uma das primeiras características observadas pelo consumidor, afetando a aceitabilidade do produto (ZOULIAS; PIKNIS; OREOPOULOU, 2000). Entre os fatores que contribuem para a formação da cor, estão o tempo de cozimento e os ingredientes utilizados na formulação (CRONIN, PREIS, 2000).

A Tabela 16 apresenta os valores de luminosidade e as coordenadas de cromaticidade a^* e b^* das formulações conforme delineamento experimental.

Tabela 16. Respostas da avaliação tecnológica de biscoitos usando planejamento fatorial 2^2 para os parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*)

Ensaio	X ₁	X ₂	L*	a*	b*
1	5,9	4,4	68,96±0,06	10,61±0,13	34,43±0,08
2	34,1	4,4	61,61±0,06	12,70±0,02	34,96±0,06
3	5,9	25,6	60,57±0,10	17,87±0,09	38,82±0,05
4	34,1	25,6	63,73±0,21	14,70±0,18	35,30±0,20
5	0	15	62,99±0,07	15,95±0,06	37,33±0,02
6	40	15	51,10±0,06	18,23±0,02	34,24±0,03
7	20	0	72,02±0,05	5,63±0,05	30,93±0,04
8	20	30	62,46±0,20	16,29±0,13	38,05±0,06
9	20	15	57,17±0,04	17,28±0,04	37,00±0,04
10	20	15	57,80±0,17	16,84±0,42	36,74±0,47
11	20	15	57,67±0,24	17,28±0,26	36,69±0,13

x₁ = flocos de aveia; x₂ = valores de CPS; L* = luminosidade; a* e b* = coordenadas de cromaticidade.

As Tabelas 17, 18 e 19 apresentam a estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para luminosidade (L*), coordenadas de cromaticidade a^* e b^* , respectivamente, ao nível de 95% de confiança.

Tabela 17. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para luminosidade (L*), ao nível de 95% de confiança

Fator	Efeitos	P
Média	57,541	<0,001
Flocos de aveia (%) (L)	-5,249	0,032
Flocos de aveia (%) (Q)	0,280	0,900
CPS (%) (L)	-4,952	0,039
CPS (%) (Q)	10,534	0,004
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	5,257	0,091

L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

Tabela 18. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para a coordenada a*, ao nível de 95% de confiança

Fator	Efeitos	P
Média	17,133	<0,001
Flocos de aveia (%) (L)	0,535	0,544
Flocos de aveia (%) (Q)	-0,062	0,952
CPS (%) (L)	6,087	0,001
CPS (%) (Q)	-6,229	0,001
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	-2,628	0,073

L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

Tabela 19. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para a coordenada b*, ao nível de 95% de confiança

Fator	Efeitos	P
Média	36,805	<0,001
Flocos de aveia (%) (L)	-1,842	0,048
Flocos de aveia (%) (Q)	-0,651	0,477
CPS (%) (L)	3,706	0,003
CPS (%) (Q)	-1,952	0,069
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	-2,028	0,099

L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

Observa-se que, para a variável dependente luminosidade, as variáveis independentes flocos de aveia e CPS apresentaram efeito linear significativo ($p < 0,05$), o que indica que aumentando a concentração de flocos de aveia e CPS, a luminosidade observada nos biscoitos

diminui, gerando coloração mais escura. Pérez et al. (2013) também encontrou resultados que mostram que o incremento de CPS produz uma redução linear dos valores de luminosidade, sendo significativo o aumento do desenvolvimento da cor. Assis et al. (2009) encontraram resultados semelhantes em relação a utilização de farinha de aveia em substituição a farinha de trigo.

Para a variável dependente coordenada de cromaticidade a^* , a variável independente CPS apresentou efeito significativo ($p < 0,05$), mostrando que com o aumento da concentração de CPS, pode-se verificar um aumento da intensidade da cor vermelha. Para a variável dependente coordenada de cromaticidade b^* , ambas variáveis (CPS e flocos de aveia) apresentaram efeito significativo, porém negativo para flocos de aveia e positivo para CPS, indicando que com o aumento das concentrações de flocos de aveia ocorre diminuição da intensidade de amarelo (b^*) e com o aumento da concentração de CPS, ocorre aumento na intensidade do amarelo (b^*).

A variação da cor dos biscoitos pode ser explicada como o resultado do desenvolvimento da reação de Maillard entre a lactose do CPS e os grupos livres amino-lisina e pelo aumento da concentração de flocos de aveia, pois os mesmos possuem uma coloração mais escura que a farinha de trigo e, conseqüentemente, os biscoitos apresentaram uma coloração mais intensa à medida que foram utilizados maiores teores de flocos de aveia e de CPS. O efeito dos ingredientes no desenvolvimento da reação de Maillard em biscoitos tem de ser considerado quando da utilização de outros ingredientes em substituição da farinha de trigo, pois estas modificam os atributos sensoriais e nutricionais do produto final.

De acordo com Esteller e Lannes (2005), valores de luminosidade L^* mais altos indicam maior reflectância da luz, traduzindo-se em produtos com coloração clara e pobre em açúcares. Para Esteller (2004), maiores valores de a^* (desvio para o vermelho) indicam coloração mais escura na crosta e valores altos para b^* são traduzidos para amostras com forte coloração amarelada ou dourada.

Segundo Gutkoski et al. (2007), a cor pode ser influenciada pelos ingredientes empregados na formulação, principalmente o teor de açúcar e o tempo e a temperatura de assamento, promovendo as reações de Maillard e caramelização, variação verificada no presente trabalho.

McWatters et al. (2003) avaliaram os parâmetros de cor L^* , a^* , b^* , croma e ângulo hue de biscoitos contendo diferentes proporções de farinha de trigo, farinha de fonio e farinha de *cowpea* (*Vigna sinenses*). As superfícies superior e inferior dos biscoitos apresentaram diferenças de coloração, sendo influenciadas pelas farinhas utilizadas. Os biscoitos contendo

50 % de farinha de *cowpea* e 50 % de farinha de trigo apresentaram o maior valor para L^* , sendo biscoitos mais claros. Biscoitos com maior croma (intensidade da cor) foram produzidos pelas formulações contendo 50 % de farinha de trigo e 50 % de farinha de *cowpea* e 75 % de farinha de fonio e 25 % de farinha de *cowpea*.

Biscoitos contendo diferentes proporções de concentrado proteico de soro e mel foram avaliados quanto aos parâmetros L^* , a^* e b^* . A presença de mel nas formulações aumentou o valor de a^* e b^* e reduziu o valor de L^* em relação ao biscoito controle, indicando biscoitos mais vermelhos, amarelos e escuros, respectivamente (CONFORTI; LUPANO, 2004). Também Lee e Brennan (2005) avaliaram os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* na superfície interna e externa de biscoitos contendo diferentes proporções de isolado protéico de soja. Foram identificadas diferenças significativas nos parâmetros L^* e a^* na superfície externa dos biscoitos. O biscoito contendo 15 % de isolado proteico de soja apresentou o menor valor de L^* , apresentando, portanto, coloração mais escura em relação às demais formulações. A formulação contendo 15 % de isolado proteico de soja apresentou maior valor para o parâmetro a^* , indicando coloração mais vermelha. Com o aumento da proporção de isolado proteico de soja houve um aumento nos parâmetros a^* e b^* e redução do parâmetro L^* na superfície interna dos biscoitos. Gallagher, Kenny e Arendt (2005) avaliaram a influência de concentrado proteico de soro e caseinato de sódio no parâmetro de luminosidade (L^*) de formulações de biscoitos. Todos os biscoitos contendo proteína láctea exibiram o menor valor de L^* quando comparados ao biscoito padrão, devido à reação de Maillard entre proteínas e açúcares redutores.

De acordo com a análise de variância da regressão de luminosidade, coordenada a^* e b^* (Tabela 20), observou-se que os dados experimentais se ajustaram ao modelo de segunda ordem, visto que $F_{\text{calculado}}$ foi maior ao F_{tabelado} , com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,90425, 0,954 e 0,897, respectivamente.

Tabela 20. Análise de variância para a cor dos biscoitos

Resposta	GL	SQ	QM	F_{calculado}	F_{tabelado}	R²
Luminosidade (L*)						
Regressão	5	298,8056	59,76112	9,4436803	5,05	0,90425
Resíduo	5	31,6408	6,32816			
Erro	5	31,6408				
Total	10	330,4464				
a*						
Regressão	5	140,404	28,081	20,862	5,050	0,954
Resíduo	5	6,730	1,346			
Erro	5	6,730				
Total	10	147,134				
b*						
Regressão	5	43,617	8,723	8,698	5,050	0,897
Resíduo	5	5,015	1,003			
Erro	5	5,015				
Total	10	48,631				

GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio (QM=SQ/GL); Valor F = teste de Fisher; R² = coeficiente de determinação (%).

O modelo matemático empírico de 2ª ordem, obtido está apresentado nas Equações 3, 4 e 5.

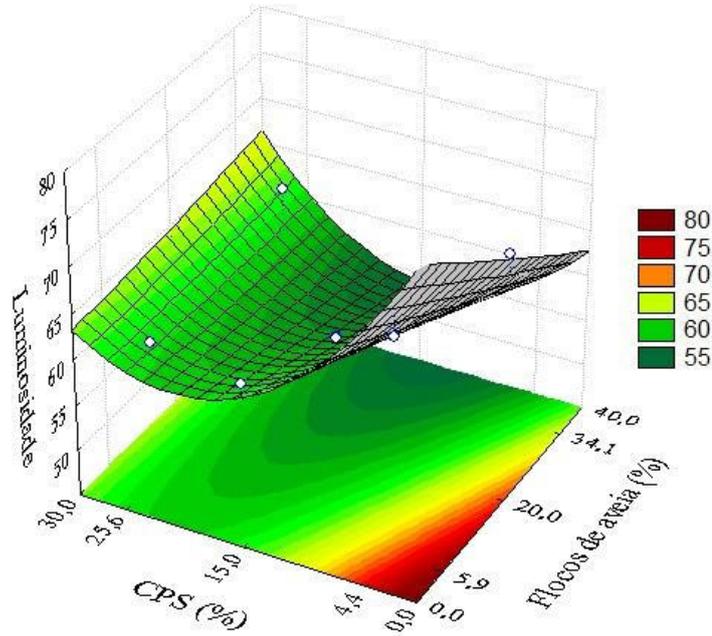
$$L^* = 57,54053 - 2,62475Aveia - 2,47624CPS + 5,26710CPS^2 \quad (3)$$

$$a^* = 17,13347 + 3,04354CPS - 3,11457CPS^2 \quad (4)$$

$$b^* = 36,80479 - 0,92110Aveia + 1,85308CPS \quad (5)$$

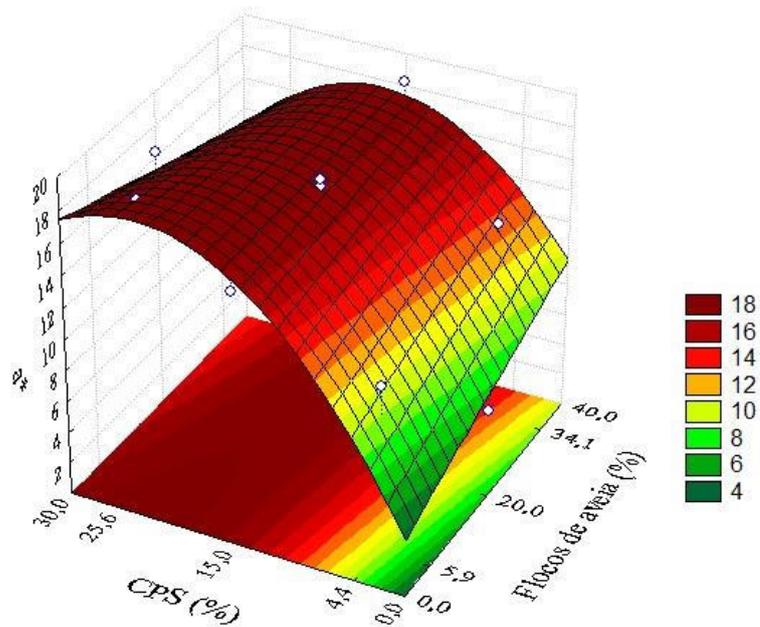
Considerando que o modelo quadrático foi válido para a variável resposta flocos de aveia e CPS, o mesmo foi utilizado para gerar a superfície de resposta e confirmar os resultados observados na análise de efeitos estimados (Figuras 15, 16 e 17).

Figura 15. Superfície de reposta para luminosidade (L^*) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%)



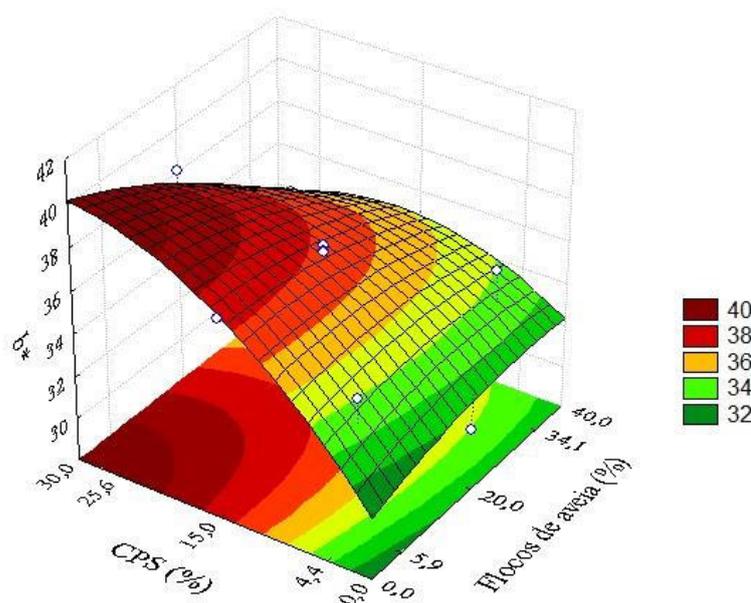
Fonte: elaborado pelo autor (2016).

Figura 16. Superfície de reposta para a coordenada a^* nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%)



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

Figura 17. Superfície de resposta para a coordenada b^* nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%)



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

4.1.2.3 Textura dos biscoitos

A textura é uma característica muito importante da qualidade e contribui de forma significativa para a aceitação global da qualidade dos produtos alimentares (MAMAT, 2010). A dureza dos produtos está relacionada com a força aplicada para ocasionar uma deformação ou rompimento da amostra e é correlacionada com a mordida humana durante a ingestão dos alimentos. A força máxima avaliada para produtos panificados é dependente da formulação, umidade da massa e conservação (ESTELLER, LANNES, 2005). A fraturabilidade está associada à crocância dos biscoitos. Da mesma forma que a dureza, são desejados valores baixos de fraturabilidade, que juntos resultam em produto mais crocante (ASSIS et al. 2009).

A Tabela 21 apresenta os resultados de dureza e fraturabilidade dos biscoitos elaborados com diferentes substituições de farinha de trigo por flocos de aveia e CPS.

Tabela 21. Respostas da avaliação tecnológica de biscoitos usando planejamento fatorial 2^2 para dureza e fraturabilidade

Ensaio	X ₁	X ₂	Dureza (g)	Fraturabilidade (mm)
1	5,9	4,4	1831,69±75	12,89±0,13
2	34,1	4,4	1392,19±99,18	11,12±0,25
3	5,9	25,6	5801,13±683,19	15,37±0,05
4	34,1	25,6	3233,35±79,15	15,04±0,28
5	0	15	4207,72±266,22	14,31±0,39
6	40	15	3943,82±232,66	10,97±0,37
7	20	0	937,35±68,58	11,33±0,54
8	20	30	7105,66±708,33	15,42±0,10
9	20	15	3688,63±64,83	13,34±0,76
10	20	15	3782,05±524,47	12,26±0,85
11	20	15	3757,43±581,12	12,85±0,44

x₁ = valores de flocos de aveia; x₂ = valores de CPS.

As Tabelas 22 e 23 apresentam a estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para dureza e fraturabilidade dos biscoitos, respectivamente, ao nível de 95% de confiança.

Tabela 22. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para dureza (g), ao nível de 95% de confiança

Fator	Efeitos	p
Média	36,742	0,001
Flocos de aveia (L)	-8,310	0,232
Flocos de aveia (Q)	-1,616	0,834
CPS (L)	35,675	0,002
CPS (Q)	-2,151	0,780
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	-10,436	0,281

L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

Tabela 23. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para fraturabilidade (mm), ao nível de 95% de confiança

Fator	Efeitos	p
Média	12,813	<0,001
Flocos de aveia %(L)	-1,703	0,015
Flocos de aveia %(Q)	0,126	0,830
CPS %(L)	3,053	0,001
CPS %(Q)	0,866	0,182
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	0,722	0,325

L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

Observa-se que a variável independente CPS apresentou efeito linear significativo ($p < 0,05$) sobre a dureza dos biscoitos, o que indica que aumentando a concentração de CPS, obtêm-se aumento na dureza. A maior dureza dos biscoitos com CPS pode ser atribuída à diluição da rede proteica de glúten no CPS o que torna a massa mais frágil. As proteínas do glúten formam uma rede contínua na estrutura da massa durante a mistura de farinha de trigo e água, sendo assim, as propriedades do glúten em particular têm impacto sobre o produto final (SASAKI; YASUI; KOHYAMA, 2008).

Para fraturabilidade, ambas as variáveis apresentaram efeito linear significativo, sendo uma positivo (CPS) e outra negativo (flocos de aveia), indicando que com aumento na concentração de flocos de aveia, tem-se redução na fraturabilidade e com aumento na concentração de CPS, há aumento na fraturabilidade. O efeito positivo do CPS na fraturabilidade ocasionou maior resistência do biscoito a quebra. Já o efeito negativo dos flocos de aveia, com a redução na fraturabilidade, é devido à característica da aveia de conferir crocância aos biscoitos (GUTKOSKI; PEDÓ, 2000).

De acordo com a análise de variância da regressão (Tabelas 24 e 25), observou-se que os dados experimentais se ajustaram ao modelo de segunda ordem, visto que $F_{\text{calculado}}$ foi maior ao F_{tabelado} , com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,882 e 0,922, respectivamente. Os modelos matemáticos empíricos de 2ª ordem obtidos estão apresentados nas Equações 6 e 7.

$$\text{Dureza (g)} = 3746,611 + 1818,900\text{CPS} \quad (6)$$

$$\text{Fraturabilidade (mm)} = 12,81253 - 0,85162\text{Aveia} + 1,52639\text{CPS} \quad (7)$$

Tabela 24. Análise de variância para dureza dos biscoitos

Resposta	GL	SQ	QM	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Regressão	5	29035540,640	5807108,128	7,489	5,050	0,882
Resíduo	5	3877270,549	775454,110			
Erro	5	3877270,549				
Total	10	32912811,190				

GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio (QM=SQ/GL); Valor F = teste de Fisher; R² = coeficiente de determinação (%).

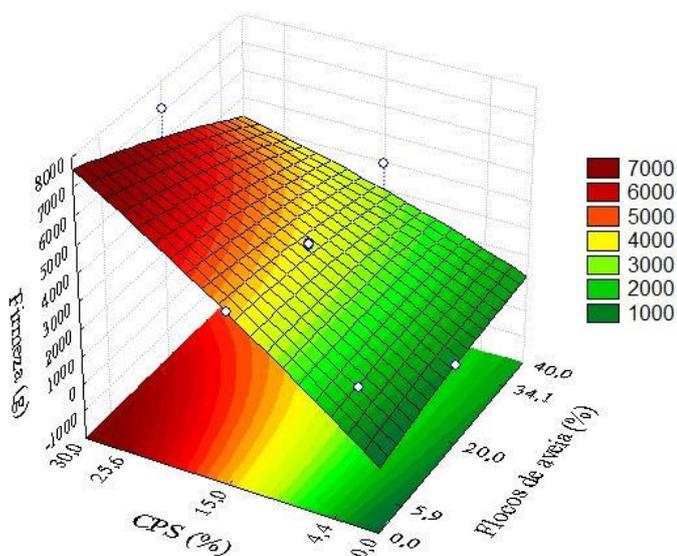
Tabela 25. Análise de variância para fraturabilidade dos biscoitos

Resposta	GL	SQ	QM	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Regressão	5	25,965	5,193	11,832	5,050	0,922
Resíduo	5	2,195	0,439			
Erro	5	2,195				
Total	10	28,160				

GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio (QM=SQ/GL); Valor F = teste de Fisher; R² = coeficiente de determinação (%).

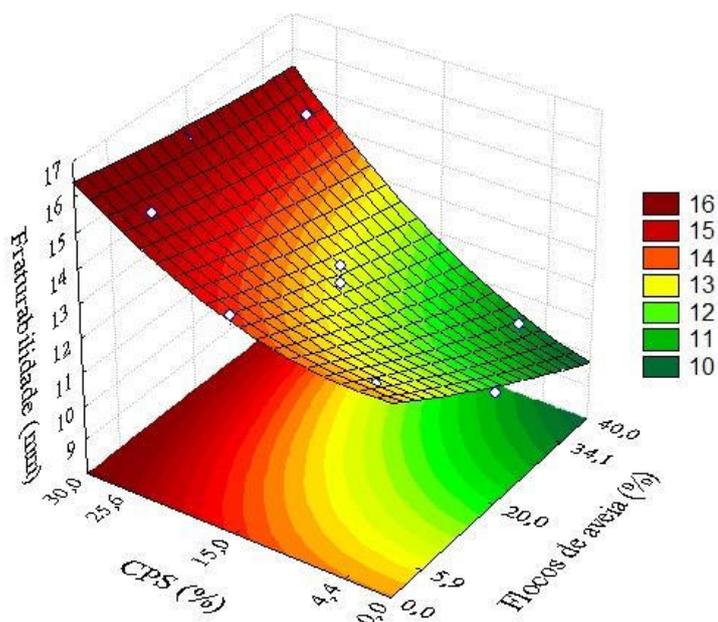
Considerando que o modelo foi válido para a variável resposta flocos de aveia e CPS, o mesmo foi utilizado para gerar a superfície de resposta da dureza e da fraturabilidade (Figuras 18 e 19).

Figura 18. Superfície de resposta para dureza (g) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%)



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

Figura 19. Superfície de reposta para fraturabilidade (mm) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%)



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

Analisando-se as superfícies de resposta, podem-se confirmar os resultados observados na análise de efeitos estimados, que mostram que altas concentrações de CPS aumentam a dureza e a fraturabilidade.

4.1.2.4 Composição química dos biscoitos

Os resultados da composição química dos biscoitos tipo cookie enriquecidos com CPS e flocos de aveia estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26. Composição química dos biscoitos elaborados com diferentes concentrações de CPS e flocos de aveia

Ensaio	Umidade	Proteínas** (%)	Cinzas** (%)	Lipídios** (%)	Fibras** (%)	Carboidratos** (%)	VCT (kcal)
1	7,87±0,01	9,85±0,12	1,50±0,03	16,10±0,28	0,24±0,01	64,66±0,39	442,92±1,43
2	8,14±0,06	10,16±0,11	1,72±0,06	16,77±0,04	0,38±0,02	63,62±0,17	446,04±0,12
3	8,56±0,01	17,64±0,18	1,83±0,06	16,94±0,04	0,17±0,02	55,05±0,25	443,22±0,07
4	8,17±0,02	18,27±0,07	1,96±0,04	16,90±0,06	0,27±0,04	54,35±0,03	442,57±0,70
5	7,98±0,03	13,79±0,22	1,56±0,04	16,02±0,02	0,16±0,01	60,16±0,24	440,02±0,07
6	8,11±0,03	14,60±0,05	1,93±0,04	16,78±0,04	0,47±0,04	59,11±0,05	445,93±0,03
7	8,22±0,08	8,51±0,14	1,50±0,05	16,62±0,02	0,25±0,02	65,41±0,04	445,30±0,54
8	8,31±0,05	19,71±0,17	2,03±0	16,67±0,44	0,30±0,01	52,89±0,66	440,40±2,01
9	8,17±0,13	14,27±0,04	1,73±0,14	16,22±0	0,35±0,03	59,55±0,07	441,21±0,11
10	8,14±0,07	14,10±0,06	1,68±0,12	16,24±0,13	0,34±0,01	60,02±0	442,63±1,46
11	8,33±0,06	13,97±0,02	1,72±0,01	16,35±0,07	0,35±0,01	59,62±0,03	441,53±0,67

**Resultados em base seca. VCT = valor calórico total.

A Tabela 27 apresenta a estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis flocos de aveia (%) e concentrado proteico de soro de leite (CPS) (%) no teor de umidade.

Tabela 27. Estimativa dos efeitos da adição de flocos de aveia (%) e adição de CPS (%) no teor de umidade dos biscoitos (%)

Fator	Efeitos	p
Média	8,178	<0,001
Flocos de aveia (%) (L)	-0,358	0,070
Flocos de aveia (%) (Q)	-0,162	0,424
CPS (%) (L)	0,633	0,010
CPS (%) (Q)	0,152	0,452
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	0,071	0,760

L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

No intervalo estudado, a variável independente CPS apresentou efeito linear significativo ($p < 0,05$) sobre o teor de umidade dos biscoitos. O efeito linear significativo e positivo (0,633) da variável CPS indica que aumento dos seus níveis aumenta o teor de umidade dos biscoitos.

A Tabela 28 apresenta a análise de variância para o teor de umidade dos biscoitos em relação à adição de flocos de aveia e a adição de CPS nas formulações de biscoitos.

Tabela 28. Análise de variância para o teor de umidade nas formulações dos biscoitos

	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F calculado	F tabelado	R²
Regressão	5	1,158	0,232	4,771	5,050	0,827
Resíduo	5	0,243	0,049			
Erro	5	0,242672				
Total	10	1,400409				

GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio (QM=SQ/GL); Valor F = teste de Fisher; R² = coeficiente de determinação (%).

De acordo com a Análise de Variância, observou-se que os dados experimentais não se ajustaram ao modelo, visto que $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao F_{tabelado} , com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,827.

A Tabela 29 apresenta a estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para composição química dos biscoitos (%), ao nível de 95% de confiança.

Tabela 29. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) na composição química dos biscoitos (%), ao nível de 95% de confiança

Fator	Efeitos	p
Proteína		
Média	14,112	<0,001
Flocos de aveia %(L)	0,522	0,004
Flocos de aveia %(Q)	-0,001	0,996
CPS %(L)	7,945	<0,001
CPS %(Q)	-0,091	0,504
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	0,157	0,341
Lipídios		
Média	16,269	<0,001
Flocos de aveia %(L)	0,428	0,025
Flocos de aveia %(Q)	0,211	0,249
CPS %(L)	0,261	0,113
CPS %(Q)	0,454	0,038
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	-0,354	0,124
Carboidratos		
Média	59,695	<0,001
Flocos de aveia %(L)	-1,184	0,002
Flocos de aveia %(Q)	-0,092	0,723
CPS %(L)	-8,745	<0,001
CPS %(Q)	-0,483	0,104
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	0,571	0,105
Cinzas		
Média	1,711	<0,001
Flocos de aveia %(L)	0,216	0,001
Flocos de aveia %(Q)	0,031	0,440
CPS %(L)	0,326	<0,001
CPS %(Q)	0,052	0,218
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	-0,042	0,380
Fibras		
Média	0,347	<0,001
Flocos de aveia %(L)	0,175	0,006
Flocos de aveia %(Q)	-0,047	0,338
CPS %(L)	-0,030	0,456
CPS %(Q)	-0,088	0,108
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	-0,015	0,787

L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

Na Tabela 29, pode-se observar que houve efeito linear significativo para a variável independente flocos de aveia em todas as variáveis resposta (proteínas, lipídios, carboidratos, cinzas e fibras). Este comportamento é esperado para proteína, lipídios e fibras, pois os flocos de aveia apresentam maiores destes constituintes quando comparados com a farinha de trigo. Este resultado indica um ganho nutricional significativo. Resultado semelhante foi encontrado por Gutkoski et al. (2007) e Mauro, Silva e Freitas (2010).

A fibra alimentar variou entre 0,16 g/100 g e 0,47 g/100 g, com diferença significativa ($p < 0,05$). Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 1998), um alimento sólido pode ser considerado fonte de fibra, quando possui um mínimo de fibras (3,0 g/100 g), e como de alto teor de fibras, quando contém, no mínimo, 6 g/100 g. Assim, todas as formulações de biscoito não podem ser consideradas fonte de fibras.

Para a variável independente CPS, houve efeito linear significativo para as variáveis resposta proteína, carboidratos e cinzas, sendo que com o aumento da concentração de CPS há um aumento no teor de proteínas e cinzas, porém diminuição no teor de carboidratos, resultado que era esperado, devido ao alto teor de proteína presente no CPS utilizado.

De acordo com a análise de variância observou-se que os dados experimentais se ajustaram ao modelo de segunda ordem para proteína, cinzas, carboidratos e fibras, visto que $F_{\text{calculado}}$ foi maior ao F_{tabelado} , com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,99, 0,97, 0,99 e 0,84, respectivamente (Tabela 30). Os modelos matemáticos empíricos de 2ª ordem obtidos estão apresentados nas Equações 8, 9, 10 e 11. Considerando que o modelo foi válido para a variável resposta flocos de aveia e CPS, o mesmo foi utilizado para gerar a superfície de resposta para proteína, cinzas, carboidratos e fibras (Figura 20, 21, 22 e 23).

$$\text{Proteína (\%)} = 14,11247 + 0,26107\text{Aveia} + 3,97254\text{CPS} \quad (8)$$

$$\text{Cinzas (\%)} = 1,711154 + 0,107996\text{Aveia} + 0,163013\text{CPS} \quad (9)$$

$$\text{Carboidratos (\%)} = 59,695 - 0,592\text{Aveia} - 4,373\text{CPS} \quad (10)$$

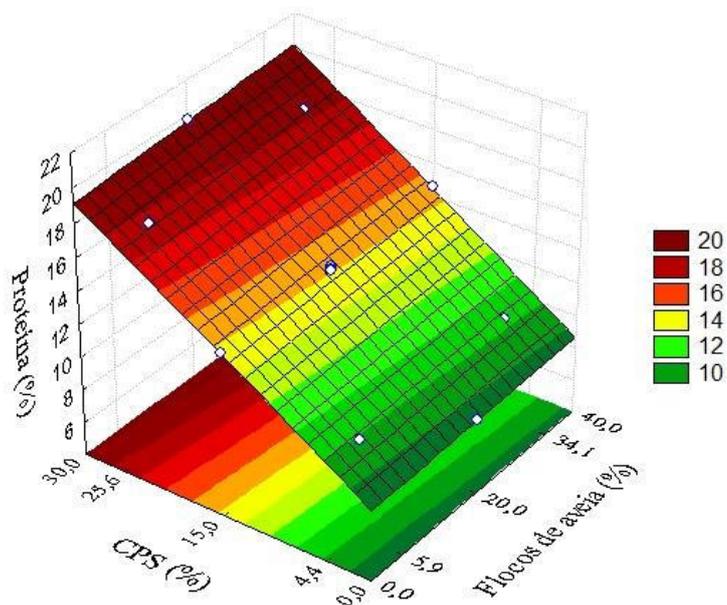
$$\text{Fibras (\%)} = 0,347 + 0,087\text{Aveia} \quad (11)$$

Tabela 30. Análise de variância para a composição química dos biscoitos

Resposta	GL	SQ	QM	F_{calculado}	F_{tabelado}	R²
Proteínas						
Regressão	5	126,453	25,291	1139,469	5,050	0,999
Resíduo	5	0,111	0,022			
Erro	5	0,111				
Total	10	126,564				
Cinzas						
Regressão	5	0,311	0,062	32,268	5,050	0,970
Resíduo	5	0,010	0,002			
Erro	5	0,010				
Total	10	0,321				
Carboidratos						
Regressão	5	169,276	33,855	569,552	5,050	0,998
Resíduo	5	0,297	0,059			
Erro	5	0,297				
Total	10	169,573				
Fibras						
Regressão	5	0,074	0,015	5,306	5,050	0,841
Resíduo	5	0,014	0,003			
Erro	5	0,014				
Total	10	0,088				

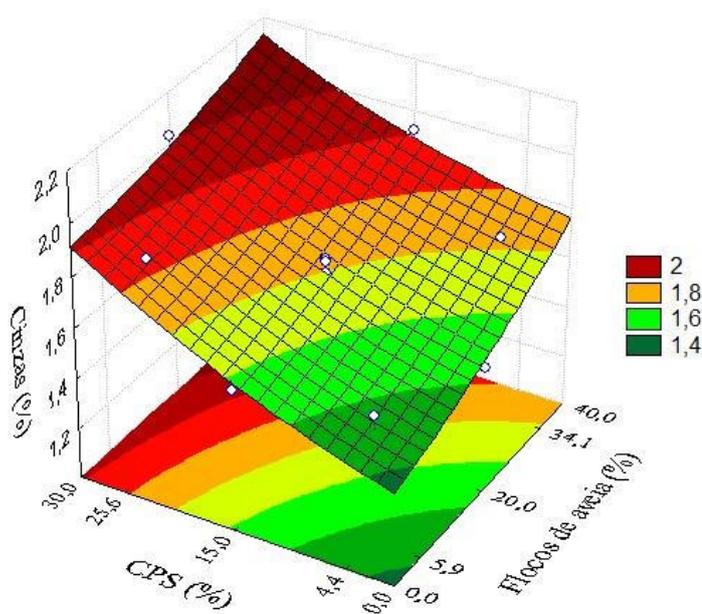
GL = graus de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio (QM=SQ/GL); Valor F = teste de Fisher; R² = coeficiente de determinação (%).

Figura 20. Superfície de reposta para proteínas (%) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%)



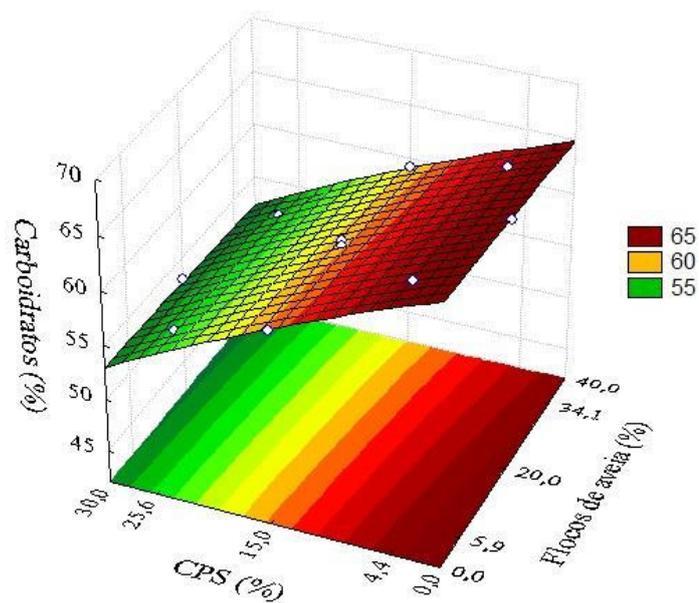
Fonte: elaborado pelo autor (2016).

Figura 21. Superfície de reposta para cinzas (%) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%).



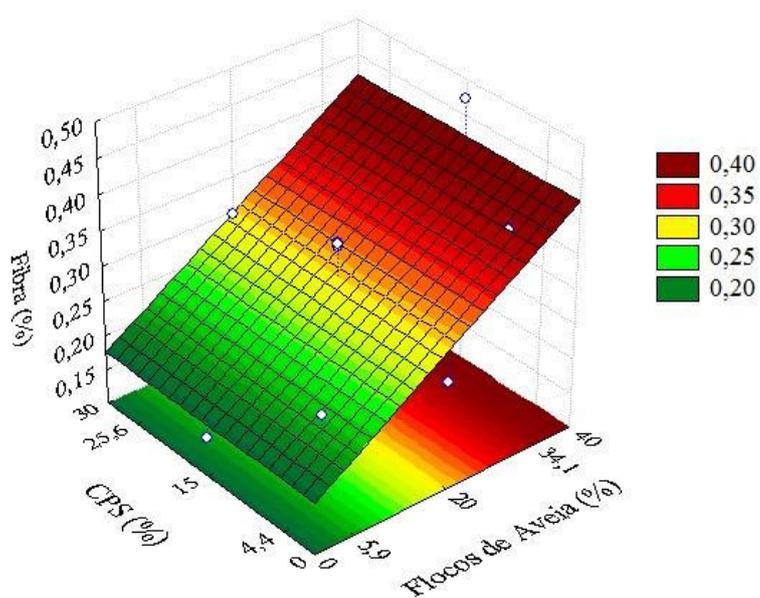
Fonte: elaborado pelo autor (2016).

Figura 22. Superfície de resposta para carboidratos (%) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%)



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

Figura 23. Superfície de resposta para fibras (%) nos ensaios do delineamento experimental de biscoitos em função do CPS (%) e flocos de aveia (%)



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

A Tabela 31 apresenta a estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para o valor calórico total (kcal.100g⁻¹), ao nível de 95% de confiança.

Tabela 31. Estimativa dos efeitos lineares (L) e quadráticos (Q) das variáveis CPS (%) e flocos de aveia (%) para o valor calórico total (kcal.100g⁻¹), ao nível de 95% de confiança

Fator	Efeitos	p
Média	441,789	<0,000
Flocos de aveia (L)	2,709	0,032
Flocos de aveia (Q)	1,579	0,209
CPS (L)	-2,533	0,040
CPS (Q)	1,453	0,242
Flocos de aveia (%) x CPS (%)	-1,886	0,206

L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

Os biscoitos tipo cookie experimentais apresentaram densidade energética variando de 440,02 kcal.100 g⁻¹ para 445,93 kcal.100 g⁻¹, com efeito linear significativo para ambas as variáveis. Observa-se que, aumentando a concentração de flocos de aveia, há um aumento no valor energético, resultado diferente do encontrado por Mauro, Silva e Freitas (2010). Já com aumento na concentração de CPS há redução nesta resposta. Este resultado deve-se ao maior conteúdo de lipídios da aveia em comparação com a farinha de trigo, ocasionado aumento da densidade energética.

Os resultados das análises físico-químicas nos mostram que os biscoitos dos ensaios 2 (flocos de aveia 34,1% e CPS 4,4%) e o ponto central (flocos de aveia 20% e CPS 15%) apresentam as melhores características tecnológicas, com expansão, cor e textura característicos de cookies. Já para a composição química, a formulação 8 (flocos de aveia 20% e CPS 30%) foi o que apresentou maior ganho nutricional devido ao alto teor de proteínas. Assim, as formulações selecionadas para a análise sensorial e as análises nutricionais serão a 2, 8 e o ponto central.

4.1.3 Análise sensorial

A descrição do perfil de consumidores está apresentada na Tabela 32. Os consumidores foram principalmente do sexo feminino, com média de $25,9 \pm 9,2$ anos de idade, variando de 18 a 48 anos. A maioria dos consumidores apresentou escolaridade de superior incompleto, cor branca e estado civil solteiro.

Tabela 32. Perfil descritivo de consumidores participantes dos testes de análise sensorial, Passo Fundo/RS, 2016

Variável	Categoria	n ^a	%
Sexo	Masculino	15	23,1
	Feminino	50	76,9
Raça/cor	Branca	60	92,3
	Parda	4	6,2
	Negra	1	1,5
Estado civil	Solteiro	52	80
	Casado	10	15,4
	União estável	3	4,6
Escolaridade	Fundamental completo	1	1,5
	Médio completo	3	4,6
	Superior incompleto	45	69,2
	Superior completo	3	4,6
	Pós-graduação	13	20

n: número de consumidores, ^a n = 65.

A frequência de consumo de biscoitos, obtida com o questionário aplicado nos testes sensoriais, está apresentada na Tabela 33. As percentagens da frequência de consumo demonstram que a maioria consome biscoitos de uma vez por semana para duas a três vezes por semana e de vários tipos, sendo o mais consumido o biscoito doce, seguido pelo salgado.

Tabela 33. Frequência de consumo (%) de biscoitos por consumidores participantes dos testes sensoriais, Passo Fundo/RS, 2016

Variável	Categoria	n	%
Consumiu biscoitos no último mês?	Sim	61	93,8
	Não	4	6,2
Frequência de consumo de biscoitos do último mês	Uma vez por mês	3	4,8
	Quinzenal	12	19,4
	Uma vez por semana	18	29
	Duas a três vezes por semana	24	38,7
	Todos os dias	5	8,1
Tipo de biscoito consumido	Integral	39	61,9
	Doce	51	81
	Salgado	43	68,3
	Com aveia	33	52,4

O resultado do teste sensorial ordenação preferência está apresentado na Tabela 34. De acordo com o teste de Friedman, houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as amostras de biscoitos. As melhores notas do teste ordenação preferência foram atribuídas aos biscoitos contendo as menores concentrações de CPS. Assim, os biscoitos preferidos foram aqueles com adição de 4,4 e 15 % de CPS e 34,1 e 20% de aveia. A escolha de alimentos depende de muitos fatores, que de diferentes maneiras devem influenciar o comportamento humano, resultando na escolha de algum e rejeição de outro produto (BABICZ-ZIELINSKA, 1999). Esse resultado confirmou a influência dos hábitos alimentares dos consumidores, os quais estão familiarizados com produtos de panificação enriquecidos com aveia (52,4%).

Tabela 34. Distribuição de notas (%) de acordo com a preferência de consumidores (n = 65) na análise sensorial de biscoitos enriquecidos com CPS e aveia, Passo Fundo/RS, 2016

Formulações ^a	Notas ^b			Soma das ordens ^c
	1	2	3	
F2	32 (49,2%)	18 (27,7%)	15 (23,1%)	113 ^a
F8	6 (9,2%)	17 (26,2%)	42 (64,6%)	166 ^b
PC	27 (41,5%)	30 (46,2%)	8 (12,3%)	111 ^a

^a F2: biscoito contendo 4,4% de CPS e 34,1% de aveia; F8: biscoito contendo 30% de CPS e 20% de aveia; PC: biscoito contendo 15% de CPS e 20% de aveia.

^b 1 = amostra mais preferida; 2 = intermediária; 3 = amostra menos preferida.

^c Soma das ordens de cada amostra = (1 x número de notas 1) + (2 x número de notas 2) + (3 x número de notas 3). Valores médios na mesma coluna seguidos por letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Os biscoitos das três formulações também foram avaliados através de teste de aceitabilidade quanto aos atributos cor, sabor, odor, textura e nota global. Para comparar a média destes atributos entre as três amostras de biscoitos foi aplicado o teste não paramétrico de Friedman. Os resultados estão apresentados na Tabela 35 e indicam que o biscoito da formulação ponto central apresentou o melhor resultado para os atributos cor, textura e nota geral e o biscoito da formulação 2 (4,4% de CPS e 34,1% de aveia) apresentou melhor resultado para sabor ($p < 0,05$). O atributo odor não apresentou diferença significativa entre as amostras.

Tabela 35. Resultados do teste de aceitação de biscoitos enriquecidos com concentrado proteico de soro de leite e aveia. Passo Fundo/RS, 2016

Atributo sensorial avaliado	F2*	F8*	PC*	p-valor**
Cor	7,03±1,53	7,58±1,11	7,94±0,91	0,002
Sabor	7,91±0,99	7,40±1,19	7,82±1,15	0,004
Odor	7,65±1,16	7,43±1,13	7,58±1,11	0,208
Textura	7,48±1,51	7,22±1,21	7,86±0,99	0,001
Nota global	7,65±1,17	7,43±1,28	7,92±0,92	0,007

*F2: biscoito contendo 4,4% de CPS e 34,1% de aveia; F8: biscoito contendo 30% de CPS e 20% de aveia; PC: biscoito contendo 15% de CPS e 20% de aveia.

** Teste de Friedman.

Nos últimos anos, os consumidores demonstraram uma tendência à consciência mais saudável em relação a alimentos e à procura de produtos com propriedades funcionais, adicionais ao valor nutricional (HEKMAT; REID, 2006). Assim, as informações sobre a aveia

e CPS poderiam influenciar a aceitabilidade dos biscoitos avaliados. De acordo com Gutkoski et al. (2007), maiores quantidades de flocos de aveia permitem a elaboração de biscoitos de melhor textura e com sabor mais acentuado. Em seu estudo com utilização do concentrado de alto teor de β -glucanas na elaboração de biscoitos de aveia tipo cookie com altos teores de fibra alimentar, as melhores notas atribuídas pelos provadores foram para as formulações com maiores quantidades de flocos de aveia e concentrado de β -glucanas.

No teste de intenção de compra aplicou-se o teste não paramétrico de Friedman. Os resultados indicam que o biscoito da formulação ponto central apresentou a melhor média, com diferença significativa, estando entre as escalas “provavelmente eu compraria (4)” e “certamente eu compraria (5)” (Tabela 36).

Tabela 36. Resultado do teste de intenção de compra para formulações de biscoito contendo CPS e aveia

Formulações	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	p-valor*
F2	3,95	0,89	2	5	0,001
F8	3,66	0,91	1	5	
PC	4,17	0,74	3	5	

*F2: biscoito contendo 4,4% de CPS e 34,1% de aveia; F8: biscoito contendo 30% de CPS e 20% de aveia; PC: biscoito contendo 15% de CPS e 20% de aveia.

** Teste de Friedman.

Como não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre a preferência dos biscoitos das formulações F2 (4,4% de CPS e 34,1% de aveia) e ponto central (15% de CPS e 20% de aveia) pelos consumidores, a aceitabilidade dos atributos avaliados foi significativa para a formulação ponto central e o teste de intenção de compra também foi significativo para o ponto central, este foi o biscoito selecionado para o estudo clínico, contendo 15% de CPS e 20% de aveia.

4.1.4 Análises nutricionais

4.1.4.1 Composição em minerais

A concentração de alguns minerais essenciais nas três formulações selecionadas e na formulação padrão é apresentada na Tabela 37. Comparando as três formulações desenvolvidas, a formulação F8, a qual contém maior quantidade de CPS (30%), observam-se valores significativamente superiores de cálcio, potássio e sódio, devido as próprias características do

CPS. Se compararmos a formulação padrão com o ponto central, nota-se que apenas ferro e sódio apresentam valores semelhantes. Para os outros minerais, o ponto central apresenta superiores valores, sendo estes significativos a nível de 95% de confiança.

Tabela 37. Minerais em miligramas por 100 gramas dos biscoitos segundo formulações

Elemento mineral ^a	F2 ± DP	F8 ± DP	PC ^b ± DP	FP ^c ± DP	RDA ^d (mg/dia)	% ADEQ ^e
Cálcio	421,69 ^c ±10,26	868,25 ^a ±14,65	644,83 ^b ±3,47	305,77 ^d ±7,11	1000	64,5
Cobre	1,03 ^a ±0,0	0,62 ^b ±0,0	0,62 ^b ±0,0	0,41 ^c ±0,0	0,9	68,9
Ferro	9,70 ^a ±0,0	8,43 ^a ±0,36	6,12 ^b ±0,0	6,64 ^b ±0,73	8	76,5
Potássio	1929,07 ^b ±69,9	2151,65 ^a ±34,9	1660,28 ^c ±29,5	964,58 ^d ±35,7	4700	35,3
	5	8	1	6		
Magnésio	135,42 ^{ab} ±1,68	137,44 ^a ±0,23	133,97 ^{ab} ±0,93	131,61 ^b ±1,70	320	41,9
Manganês	10,55 ^a ±0,30	4,94 ^b ±0,0	4,63 ^b ±0,16	1,18 ^c ±0,15	1,8	257,2
Sódio	298,65 ^a ±5,35	304,62 ^a ±3,11	268,27 ^b ±5,56	263,48 ^b ±7,43	1500	17,9
Zinco	4,87 ^a ±0,04	3,11 ^b ±0,08	3,06 ^b ±0,08	2,05 ^c ±0,04	8	38,2

Valores médios na mesma linha seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

^aResultados são médias ± desvios padrão de duas repetições. ^bPC: ponto central; ^cFP: formulação padrão.

^dRecomendações para mulheres (19 a 50 anos) (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997, 2002 e 2004). ^e% de ADEQ.: percentual de adequação com a RDA.

Os valores de RDA, apresentados na Tabela 37, são para mulheres na faixa etária de 19 a 50 anos. Optou-se por comparar com este grupo pois é a faixa etária das mulheres selecionadas para o estudo clínico. Comparando a composição mineral do biscoito da formulação ponto central com a RDA, pode-se concluir que 100g dos biscoitos poderiam fornecer quantidades consideráveis da maioria dos minerais analisados.

Segundo a FAO (2013), os principais fatores da dieta que afetam a massa óssea são, principalmente, cálcio e vitamina D, embora outros nutrientes como proteínas, potássio, zinco, vitaminas A, C e K, também desempenham papel importante neste processo. Segundo a IOF (2006) o magnésio também desempenha papel importante no metabolismo ósseo. No biscoito desenvolvido neste estudo, verificou-se aumento significativo das quantidades de cálcio, potássio e zinco, quando comparadas a formulação padrão, além de boa quantidade de magnésio, o que afetaria positivamente a saúde óssea.

O zinco estaria relacionado a um papel na regulação da remodelação óssea por ser um constituinte mineral do osso. Este mineral também é necessário para o funcionamento correto da enzima denominada fosfatase alcalina que é necessária para a mineralização do osso. Deficiência severa de zinco é geralmente vista em conjunto com a desnutrição energético proteica e está associada com o crescimento ósseo deficiente em crianças. Contudo, graus mais

leves de deficiência de zinco têm sido relatados em idosos e poderiam contribuir para um estado precário dos ossos (IOF, 2006). Um estudo observacional com homens idosos mostrou que os homens com os níveis mais baixos de zinco no sangue apresentaram menor densidade mineral óssea do que os homens com mais alto nível de zinco e também que níveis sanguíneos de zinco foram inferiores nos homens com osteoporose do que nos homens sem osteoporose (HYUN; BARRETT-CONNOR; MILNE, 2004).

4.1.4.2 Composição em ácidos graxos

As três formulações analisadas apresentaram maiores quantidades de ácidos insaturados do que saturados, com 60,4%, 52,8% e 50,3%, respectivamente das formulações F2, F8 e PC. Observa-se que a formulação F2, com maior quantidade de aveia (34,1%), apresentou a maior quantidade de ácidos insaturados. Segundo Weber, Gustkoski e Elias (2002), ao analisar a composição em ácidos graxos de grãos de aveia da cultivar UPF-18, encontraram 80,95% de ácidos graxos insaturados, sendo atribuídos 38,21% ao oléico, 40,99% ao linoléico e 1,75% ao linolênico. Os mesmos autores concluíram que o ambiente exerce influência sobre o conteúdo dos ácidos graxos e o fator varietal contribui com mais de 70% da variação dos ácidos graxos nas diferentes cultivares de aveia.

Em biscoitos da formulação F8 (com maior quantidade de CPS), encontrou-se quantidade superior dos ácidos graxos saturados mirístico e pentadecanóico. No ácido araquidônico também encontrou-se diferença significativa entre as amostras, sendo o biscoito F2, que possui maior quantidade de aveia (34,1%), o que apresentou quantidade superior. Para os ácidos monoinsaturados, a formulação ponto central apresentou quantidade superior de ácido oleico. Em relação aos ácidos graxos poli-insaturados, a formulação ponto central apresentou a menor quantidade de ácido linoléico configuração tanto cis como trans, e maior quantidade do ácido linolênico, com diferenças significativas entre as amostras (Tabela 38). Ressalta-se que foi utilizada a mesma quantidade de gordura e do mesmo tipo em todas as formulações, apenas variando os teores de CPS e aveia.

Tabela 38. Ácidos graxos saturados e insaturados em gramas por 100 gramas dos biscoitos segundo formulações

Ácidos graxos (g)	F2 ± DP	F8 ± DP	PC ± DP
Saturados			
C12:0 láurico	0,063 ^a ±0,020	0,081 ^a ±0,004	0,037 ^a ±0,0
C14:0 mirístico	0,130 ^b ±0,032	0,231 ^a ±0,001	0,106 ^b ±0,008
C15:0 pentadecanóico	0,020 ^{ab} ±0,007	0,036 ^a ±0,004	0,014 ^b ±0,0
C16:0 palmítico	4,330 ^a ±0,377	4,597 ^a ±0,559	4,921 ^a ±0,701
C17:0 heptadecanóico	0,072 ^a ±0,014	0,075 ^a ±0,0	0,025 ^a ±0,024
C18:0 esteárico	4,283 ^a ±0,175	4,335 ^a ±0,770	3,783 ^a ±0,438
C20:0 araquidônico	0,296 ^a ±0,031	0,278 ^{ab} ±0,0	0,217 ^b ±0,0
Total	9,19	9,63	9,10
Insaturados			
Monoinsaturados			
C16:1 palmitoléico	0,036 ^a ±0,015	0,028 ^a ±0,0	0,010 ^a ±0,0
C18:1 oléico	3,102 ^b ±0,0	3,615 ^{ab} ±0,560	5,158 ^a ±0,442
Poli-insaturados			
C18:2 linoléico cis	6,216 ^a ±0,0	3,504 ^b ±0,0	3,246 ^c ±0,0
C18:2 linoléico trans	4,458 ^a ±0,0	3,488 ^b ±0,0	0,330 ^c ±0,0
C18:3 linolênico	0,202 ^b ±0,056	0,136 ^b ±0,0	0,478 ^a ±0,0
Total	14,02	10,77	9,22

Valores com letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A gordura é um ingrediente importante de biscoitos tipo cookies pois contribui para a textura, paladar agradável e na intensidade do sabor. A maioria dos cookies contêm grandes quantidades de gordura na formulação (ZOULIAS; OREOPOULOU; TZIA, 2002). Para alguns setores da alimentação, alternativas para reduzir a quantidade de gordura são aceitáveis pelo consumidor, porém, para outros, como padarias, estas opções não trazem muito sucesso. Produtos de cereais contribuem com aproximadamente 15,6% da gordura dietética, dos quais os produtos de padaria representam pelo menos dois terços disso (MCEWAN; SHARP, 2000).

Zoulias, Oreopoulou e Tzia (2002) utilizaram cinco diferentes substitutos de gordura à base de carboidratos e de proteínas para substituir até 50% da gordura de cookies (polidextrose, maltodextrina com reduzida dextrose, produto derivado da aveia rico em β -glucana, oligofrutose (inulina) e uma mistura de micropartículas de proteínas do soro emulsionantes) e concluíram que maltodextrina com reduzida dextrose, mistura de micropartículas de proteínas

do soro emulsionantes e oligofrutose (inulina) poderiam ser usados como substitutos de gordura no preparo de cookies pois resultaram em cookies com boas características de textura.

No presente estudo, manteve-se a gordura recomendada pelo método da AACC 10-50D, porém com redução de 15% da quantidade (de 64 g para 54,4 g). Não optamos pela substituição por outro tipo de gordura pois afetaria as propriedades tecnológicas do biscoito, como citado acima pela literatura. Optamos por substituir a farinha por dois outros ingredientes (CPS e aveia) e manter os ingredientes do método original. Sugere-se que outros estudos sejam realizados com a substituição ou redução da gordura utilizada.

4.1.4.3 Composição em aminoácidos

A composição em aminoácidos da formulação ponto central e o padrão teórico para crianças pré-escolares (1 a 3 anos) (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2005) encontram-se na Tabela 39. Este padrão teórico é utilizado porque ultrapassa os valores de necessidades de aminoácidos de crianças maiores e adultos. Optou-se por fazer a composição em aminoácidos somente da formulação selecionada para o estudo clínico. Essa escolha foi baseada pelos atributos tecnológicos e sensoriais desta formulação. Todos os aminoácidos analisados ficaram acima do recomendado pela Food and Nutrition Board (2005).

Os valores obtidos para a composição dos aminoácidos essenciais da formulação analisada foram divididos pelo padrão teórico e o resultado denominado escore químico de aminoácido (Tabela 39). Este escore permitiu determinar que a formulação analisada não apresentou aminoácidos limitantes. Uma proteína que apresenta escore químico maior que o valor 1,0 para todos os aminoácidos é considerada de alto valor nutricional. E o aminoácido que apresentar escore químico menor que 1,0 é chamado aminoácido limitante. Portanto, essa formulação de biscoito é de elevado valor proteico, possuindo a capacidade dietética de suprir o organismo humano com níveis adequados de aminoácidos essenciais, podendo ser indicada para pessoas de todas as faixas etárias, particularmente esportistas e crianças, que necessitam de quantidades maiores de aminoácidos essenciais.

Tabela 39. Composição de aminoácidos e escore químico da formulação de biscoito ponto central

Aminoácidos	mg de aminoácido/g proteína		Escore de aminoácidos ^c
	Biscoito PC ^a	Padrão teórico para crianças (1 a 3 anos) ^b	
Essenciais			
Fenilalanina+tirosina	138,51	47	2,95
Histidina	39,80	18	2,21
Isoleucina	93,93	25	3,76
Leucina	171,94	55	3,13
Lisina	200,59	51	3,93
Metionina + cistina	85,97	25	3,44
Treonina	71,64	27	2,65
Triptofano ^d	nd	7	nd
Valina	95,52	32	2,99
Não essenciais			
Ácido aspártico	234,02		
Ácido glutâmico	905,85		
Serina	111,44		
Alanina	85,97		
Condicionamente essenciais			
Glicina	62,09		
Arginina	73,23		
Prolina	163,98		
Tirosina	52,54		

nd: não determinado.^a: formulação de biscoito ponto central (15% de CPS e 20% de aveia).^b: Adaptado de Food and Nutrition Board (2005). Padrão usado porque ultrapassa os valores de necessidades de aminoácidos de crianças maiores e adultos.^c: Escore químico de aminoácido (mg/g proteína amostra)/(mg/g proteína padrão teórico). ^d: O triptofano é destruído durante a hidrólise ácida da proteína, mas não é limitante em produtos proteicos.

Obesidade, diabetes e hipercolesterolemia são doenças cujo curso pode ser influenciado pelas proteínas da dieta. As dietas ricas em proteínas, especialmente ricas em aminoácidos essenciais, aminoácidos de cadeia ramificada e, particularmente, leucina, estão relacionados com o aumento da perda de peso, perda de gordura corporal, síntese de proteína muscular e diminuição de triglicerídeos e de insulina no sangue (ETZEL, 2004).

Segundo Sgarbieri (2004) a composição de aminoácidos das proteínas do soro de leite favorece a síntese de proteínas musculares (aminoácidos de cadeias ramificadas) e o que se espera é que sua ação seja altamente benéfica ao organismo humano antes, durante e após períodos de exercícios intensos e/ou prolongados.

4.1.4.4 Digestibilidade *in vitro* da proteína, escore químico de aminoácidos e escore químico de aminoácidos corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS)

Existem diferentes fontes de proteína e estas podem variar na sua composição química, bem como no seu valor nutritivo. A qualidade de uma fonte proteica é uma expressão da sua habilidade para fornecer os requerimentos de aminoácidos e nitrogênio para crescimento, manutenção e reparação. Os indicadores da qualidade nutritiva de uma proteína podem ser vários, entre eles está o valor biológico, a digestibilidade, o Coeficiente de Eficácia Proteica (*Protein Efficiency Ratio* – PER), a Utilização Proteica Líquida (*Net Protein Utilization* – NPU), entre outros (SILVA; FROTA; ARÊAS, 2012).

A digestibilidade é o primeiro fator que reflete a eficiência da utilização protéica da dieta, portanto, pode ser considerada um condicionante da qualidade nutricional dos produtos avaliados. Os valores obtidos para a digestibilidade das formulações selecionadas variaram entre 53,81% (F8) e 78,96% (F2), apresentando significância estatística (Tabela 40). Notou-se que com o acréscimo do CPS, houve uma diminuição na digestibilidade.

Tabela 40. Digestibilidade proteico *in vitro* das formulações selecionadas

% digestibilidade	Média	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo
F2	78,96 ^a	2,22	77,67	81,52
F8	53,81 ^b	3,44	50,06	56,80
PC	61,18 ^b	8,09	51,84	66,13

Os resultados são médias de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes, dentro da mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Almeida et al. (2015), encontraram valores de digestibilidade proteica *in vitro* de suplementos de concentrado proteico de soro de leite de marcas diferentes, variando de 91,7 a 88,4% ($p < 0,05$). Sindayikengera e Wen-shui (2006) encontraram valor de digestibilidade de concentrado proteico de soro de leite (80% de proteína) de 73,22% e concluíram que as proteínas do leite, caseína e as proteínas do soro, têm valor nutritivo elevado em comparação

com outras proteínas devido ao seu teor relativamente elevado de aminoácidos essenciais e boa digestibilidade. Pires et al. (2006) avaliaram a influência da fonte proteica sobre a digestibilidade e relataram que proteínas de origem vegetal exibiram menor coeficiente de digestibilidade quando comparadas com proteínas de origem animal, possivelmente devido à ausência de fatores antinutricionais, os quais, sabidamente, contribuem para diminuir a digestibilidade em alimentos de origem vegetal. Já Weber, Gutkoski e Elias (2002), encontraram uma digestibilidade de 98,86% ao analisar grãos de aveia.

Alguns autores explicam as variações encontradas nos valores de digestibilidade de concentrados proteicos de soro de leite pela composição global de tais suplementos, particularmente em relação à qualidade da proteína, a qual está possivelmente relacionada com as condições de processamento, incluindo práticas agrícolas, período de lactação, método de extração do soro de leite, método de purificação e processamento térmico (ERIKSEN et al, 2010; SINDAYIKENGERA; WEN-SHUI, 2006; ONWULATA; KONSTANCE; TOMASULA, 2004).

Em teoria, a abordagem mais lógica para avaliar a qualidade proteica é comparar o conteúdo de aminoácidos de um alimento com as necessidades humanas através do escore químico. O escore de aminoácidos é o menor valor obtido por meio da razão entre a quantidade de cada aminoácido essencial presente na proteína e o valor recomendado desse aminoácido para crianças pré-escolares (1 a 3 anos), padrão esse usado porque ultrapassa os valores de necessidades de aminoácidos de crianças maiores e adultos (FAO/WHO, 1991).

Em 1991, a FAO/WHO recomendou que o método da digestibilidade corrigida pelo escore de aminoácidos fosse adotado como método oficial para avaliação da qualidade nutritiva de uma proteína para humanos, já que a composição de aminoácidos de uma proteína conjuntamente à sua digestibilidade real são informações suficientes para se caracterizar uma proteína do ponto de vista nutritivo.

Como a composição em aminoácidos foi realizada somente para a formulação ponto central, devido esta ser a formulação selecionada para o estudo clínico, o escore químico corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS) foi feito somente para esta formulação.

Uma proteína pode ter digestibilidade máxima de 100%, mas se apresentar algum aminoácido limitante (escore de aminoácidos menor que 1), indica que o fornecimento desse aminoácido estará abaixo da recomendação, prejudicando seu valor nutritivo. Por outro lado, outra proteína pode apresentar escore de aminoácidos maior que 1 (não possuir aminoácido limitante), mas se sua digestibilidade for baixa, apenas parte da quantidade desses aminoácidos

será realmente aproveitada, já que ela não será totalmente digerida e absorvida, prejudicando também seu valor nutritivo (SILVA; FROTA; ARÊAS, 2012).

O PDCAAS atingiu o valor máximo existente para a digestibilidade corrigida pelo escore de aminoácido, que é 100% ou 1, esse valor indica que a proteína será totalmente aproveitada (Tabela 41). Como discutido no item 6.1.4.3, o perfil de aminoácidos encontrado no biscoito caracteriza esta proteína como de alto valor biológico. E o resultado do PDCAAS mostra que a mesma será totalmente aproveitada pelo organismo.

Tabela 41. Digestibilidade da proteína corrigida pelo escore de aminoácidos (PDCAAS) para a formulação ponto central

Alimento	Digestibilidade da proteína	Escore de aminoácidos	Digestibilidade corrigida pelo escore (%)*
Biscoito PC	61,18	2,21	100

* menor escore de aminoácidos encontrado x digestibilidade

4.2 ESTUDO CLÍNICO

4.2.1 Caracterização do grupo

O grupo selecionado para o estudo clínico foi composto por 15 mulheres, com média de idade de $24,8 \pm 6,4$ anos, variando de 20 a 45 anos, 86,7% de raça/cor branca, 73,3% solteiras, 86,7% com escolaridade de superior incompleto e 60% pertencentes a classe econômica B (Tabela 42).

Tabela 42. Características socioeconômicas e demográficas das mulheres participantes do estudo clínico, Passo Fundo/RS, 2016

Variável	Categoria	n	%
Raça	Branca	13	86,7
	Parda	2	13,3
Estado civil	Solteiro	11	73,3
	Casado	4	26,7
Escolaridade	Superior incompleto	13	86,7
	Superior completo	2	13,3
Classe econômica	A	1	6,7
	B	9	60
	C	4	26,6
	D	1	6,7

Em relação aos dados de consumo alimentar questionados durante a seleção do grupo, observou-se que 93,3% (n=14) das mulheres consumiram biscoitos no último mês, com uma frequência de uma vez por semana a duas e três vezes por semana (80%). Todos os tipos de biscoitos questionados apresentaram consumo acima de 50% (Tabela 43).

Tabela 43. Características de consumo de biscoitos das mulheres participantes do estudo clínico, Passo Fundo/RS, 2016

Variável	Categoria	N	%
Consumiu biscoitos no último mês?	Sim	14	93,3
	Não	1	6,7
Frequência de consumo de biscoitos do último mês	Uma vez por mês	1	6,7
	Uma vez por semana	6	40
	Duas a três vezes por semana	6	40
	Todos os dias	2	13,3
Tipo de biscoito consumido	Integral	12	80
	Doce	12	80
	Salgado	10	66,7
	Com aveia	8	53,3

4.2.2 Ingestão alimentar

A ingestão alimentar, investigada através de autoregistros de três dias, está apresentada na Tabela 44. O objetivo de avaliar a ingestão alimentar, principalmente de proteínas, foi de verificar o consumo médio para calcular a quantidade de biscoito a ser oferecida diariamente, para não oferecer proteínas em excesso e influenciar na homeostase do cálcio.

Tabela 44. Ingestão média de energia (kcal/dia), proteína (g/dia), lipídios (g/dia), carboidratos (g/dia) e cálcio (mg/dia) pelas mulheres participantes do estudo, Passo Fundo/RS, 2016

Indicadores avaliados	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Energia (kcal/dia)	1900,4	473,2	1181,7	2823,3
Proteínas (g/dia)	76,6	18,8	42,7	110,7
Carboidratos (g/dia)	255,4	65,2	151,0	355,6
Lipídios (g/dia)	63,5	27,0	25,5	125,6
Cálcio (mg/dia)	624,8	260,1	202,6	1012,4

A média de ingestão de proteína encontrada, antes da ingestão do biscoito, foi de 1,3g/kg de peso corporal/dia, com desvio padrão de 0,3, valor mínimo de 0,7g e valor máximo de 1,6g. Isso mostra que o consumo médio de proteína ultrapassou a recomendação da RDA de proteínas para mulheres adultas de 19 a 50 anos, que é 0,8g/kg de peso corporal/dia (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2005). Como apresentado na revisão de literatura, segundo Kerstetter et al. (2005), dietas com quantidade moderada de proteína, de 1,0 a 1,5g/kg de peso corporal/dia demonstram estar associadas à homeostase normal de cálcio, sem alterar o metabolismo ósseo.

A ingestão de cálcio média encontrada foi de 624,8 mg/dia, valor abaixo da RDA para mulheres de 19 a 50 anos, que é 1000 mg/dia (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997). Segundo Kerstetter et al. (2005), se a ingestão de cálcio for adequada, o aumento dietético de proteínas promove melhora na densidade óssea devido a alguns aminoácidos promoverem absorção de cálcio. No presente estudo verificou-se ingestão de cálcio abaixo do recomendado o que pode ocasionar redução dos possíveis benefícios da ingestão de CPS através do biscoito no metabolismo ósseo.

A orientação dada as mulheres participantes do estudo foi de consumir 4 biscoitos ao dia devido a elevada ingestão proteica, verificada nas mulheres participantes do estudo, antes da introdução do biscoito. Cada biscoito de 10 gramas continha 5,8 g de carboidratos, 0,86 g

de proteínas, 1,4 g de gorduras totais e 32 mg de sódio. Com a ingestão de 4 biscoitos ao dia (totalizando 3,4g de proteína, sendo 2,7g provenientes do CPS e o restante dos demais ingredientes), aumentaria para 1,4g/kg de peso corporal/dia, quantidade que não afetaria a homeostase normal do cálcio. Entende-se, também, que estes biscoitos podem ter substituído outros alimentos, o que não causaria tal variação. Quanto ao cálcio, a ingestão de 4 biscoitos aumentaria 258 mg de cálcio ao dia, quantidade considerável visto a ingestão de cálcio encontrada antes da ingestão do biscoito.

4.2.3 Estado nutricional e composição corporal

Após a ingestão dos biscoitos, as variáveis peso corporal e percentual de água corpórea da massa muscular não apresentaram diferenças significativas, com $p > 0,05$, segundo teste t pareado. A variável peso da massa gordurosa (MG) aumentou na segunda avaliação e a variável peso da massa magra (MM) reduziu na segunda avaliação ($p < 0,05$). Já peso, IMC e CC não apresentaram diferença significativa (Tabela 45). Este resultado de redução da MM era esperado quando do aumento na MG.

Tabela 45. Influência da introdução do biscoito enriquecido com concentrado proteico de soro de leite e aveia na dieta no estado nutricional e composição corporal das participantes do estudo, Passo Fundo/RS, 2016

Parâmetros avaliados	Antes				Depois				p-valor
	Média	DP	Máx.	Mín.	Média	DP	Máx.	Mín.	
Peso	58,8	5,7	70,3	51,5	58,9	5,9	71,1	51,1	0,491
IMC	22,2	2,97	30,4	18,2	22,3	3,1	30,8	18,0	0,427
CC	71,5	7,8	96	64	70,8	8,0	97	63	0,163
MM	43,62	3,33	52,4	39,2	42,33	3,59	49,6	37,8	0,004
MG	15,19	3,83	26,7	10,4	16,59	3,79	28,1	11,3	0,001
AC	68,73	1,47	71,2	65,8	68,55	1,60	71,3	65,8	0,381

IMC: Índice de massa corporal; CC: Circunferência da cintura; MM: peso da massa muscular; MG: peso da massa gordurosa; AC: percentual de água corpórea da massa magra

Katsanos et al. (2008) observou que a ingestão de proteína do soro de leite melhorou o acúmulo da proteína muscular em pessoas idosas, após ingestão de 15 g de concentrado proteico de soro de leite e pode ser explicado, em parte, por uma maior resposta à insulina, sugerindo que a estimulação da proteína muscular em idosos por CPS é mediada por mecanismos que estão além daqueles atribuídos aos aminoácidos essenciais. Neste estudo, observou-se que a

ingestão de biscoito enriquecido com CPS e aveia diminuiu a massa muscular e aumentou a massa gordurosa, resultado controverso ao esperado devido ao enriquecimento com CPS, pois é reconhecido que proteínas do soro de leite estimulam o anabolismo muscular (SGARBIERI, 2004; KATSANOS et al. 2008).

Este resultado provavelmente é devido aos demais ingredientes do biscoito, como a farinha de trigo, açúcar e gordura. Cada biscoito continha 5,8g de carboidratos e 1,4g de gordura, como o consumo foi de 4 unidades ao dia, um total de 5,6 g de gordura e 23,2g de carboidratos foi ingerida, ocasionado acúmulo de gordura no tecido adiposo.

Quanto a avaliação do estado nutricional, verificou-se que 86,6% das mulheres estavam com peso adequado 86,6% (n=13) tanto antes como depois da ingestão do biscoito, 6,7% (n=1) com sobrepeso e 6,7% (n=1) com baixo peso. Em relação a circunferência da cintura, 93,3% (n=14) apresentaram circunferência < 80 cm, caracterizando fora de risco para o desenvolvimento de doenças, tanto antes como depois da ingestão dos biscoitos.

4.2.4 Análise da formação e reabsorção óssea

Os níveis de cálcio no sangue na urina ficaram inalterados após 16 dias de consumo do biscoito enriquecido com CPS e aveia (Tabela 46). A concentração de osteocalcina no sangue aumentou significativamente após os 16 dias de ingestão ($p=0,003$), enquanto a excreção urinária de NTx tendeu a diminuir após os 16 dias, apesar de a diferença não ser significativa ($p=0,394$) (Tabela 47). As alterações individuais na concentração de osteocalcina no sangue e de NTx na urina antes e depois dos 16 dias de ingestão do biscoito estão demonstradas na Figura 24. Um aumento na concentração de osteocalcina foi verificado em treze (86,7%) das quinze mulheres e uma queda na excreção urinária de NTx foi encontrada em dez (66,7%) das participantes do estudo. A Figura 25 apresenta a correlação entre a excreção urinária de NTx e a concentração no sangue de osteocalcina antes e depois da ingestão do biscoito. Não foi encontrada correlação entre NTx e osteocalcina antes da ingestão do biscoito, mas depois dos 16 dias de ingestão do biscoito contendo CPS e aveia encontrou-se correlação, com coeficiente de 0,7902 ($p<0,001$).

Tabela 46. Níveis de cálcio no sangue e na urina das participantes do estudo, Passo Fundo, 2016

	Antes			Depois			p-valor ^b
	Média/DP ^a	Mín.	Máx.	Média/DP ^a	Mín.	Máx.	
Sangue							
Cálcio (mmol/l)	2,38±0,22	2,07	2,77	2,36±0,21	1,93	2,76	0,774
Urina							
Cálcio (mg/dl)	14,58±5,99	4,27	24,70	17,19±4,16	10,87	22,73	0,156

^a DP: desvio padrão.

^b Teste t pareado; diferenças foram consideradas significantes se $p < 0,05$.

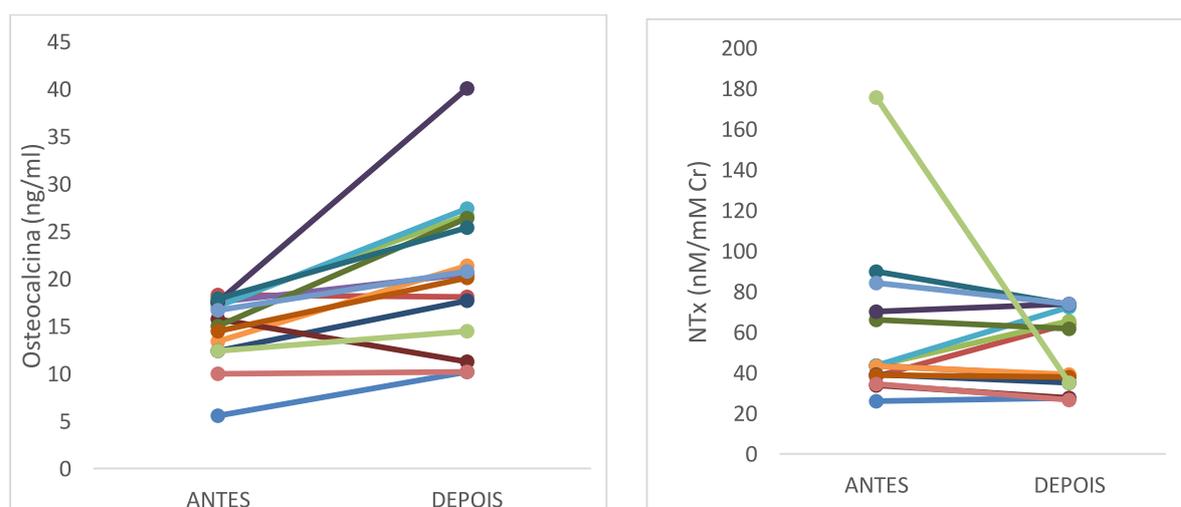
Tabela 47. Indicadores bioquímicos de remodelação óssea das mulheres participantes do estudo, antes e depois da ingestão do biscoito contendo CPS e aveia, Passo Fundo/RS, 2016

Marcadores bioquímicos	Antes			Depois			p-valor ^b
	Média/DP ^a	Mín.	Máx.	Média/DP ^a	Mín.	Máx.	
Sangue							
Osteocalcina (ng/ml)	14,78±3,54	5,60	18,30	20,72±7,90	10,20	40,10	0,003
Urina							
NTx ^a (nM/mM Cr ^a)	58,09±37,68	26,22	175,81	50,28±19,15	26,87	74,12	0,394

^aCr: creatinina; NTx: telopeptídeos aminoterminais do colágeno tipo I; DP: desvio padrão.

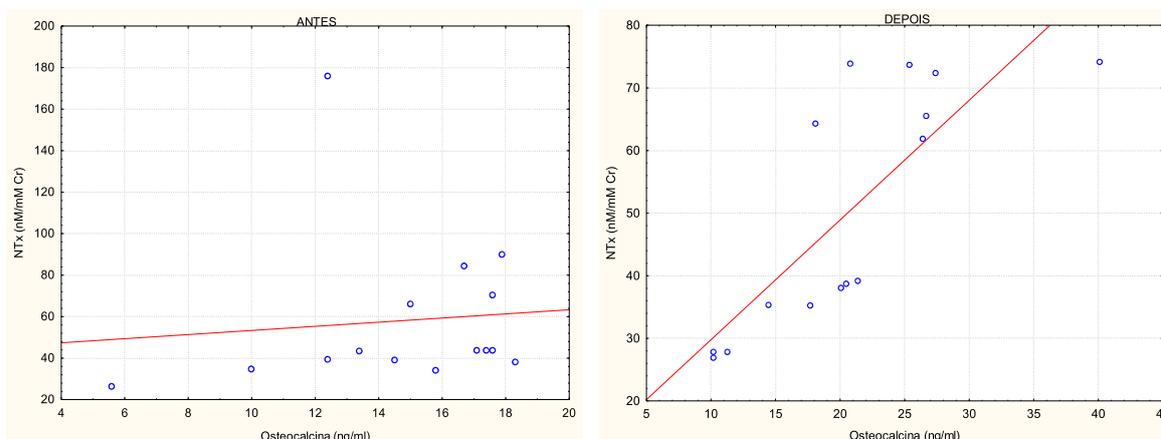
^b Teste de Wilcoxon; diferenças foram consideradas significantes se $p < 0,05$.

Figura 24. Alterações individuais nas concentrações de osteocalcina e NTX antes e depois dos 16 dias de ingestão dos biscoitos enriquecidos com CPS e aveia.



Fonte: Elaborada pelo autor (2016).

Figura 25. Relação entre excreção urinária de NTX e concentração de osteocalcina no sangue antes e depois da ingestão do biscoito enriquecido com CPS e aveia.



Fonte: Elaborada pelo autor (2016). O coeficiente de correlação foi 0,0933 ($p = 0,7409$) antes da ingestão e de 0,7902 ($p < 0,001$) depois da ingestão do biscoito. Diferenças foram consideradas significantes se $p < 0,05$. Cr: creatinina; NTX: telopeptídeos aminoterminais do colágeno tipo I.

Indicadores bioquímicos do metabolismo ósseo que refletem as mudanças ósseas mais rapidamente que a densidade mineral óssea estão disponíveis para medição pelo sangue e pela urina. Neste estudo, mensurou-se a osteocalcina como indicador de formação óssea pois as proteínas liberadas pelos osteoblastos, incluindo osteocalcina e peptídeos pró-colágeno, podem ser usados para avaliar a formação óssea. Já os produtos com colágeno, incluindo ligações cruzadas de colágeno, podem ser usados para medir a reabsorção óssea. Na última década, telopeptídeos de colágeno tipo I tornaram-se os marcadores de reabsorção óssea mais utilizados (GUAÑABENS; PERIS; MONEGAL, 2015).

Mensurou-se a excreção urinária de NTX como indicador bioquímico de reabsorção óssea pois parece mostrar maior correlação com a dinâmica do osso. Estudo realizado em Cingapura, por Dai et al. (2016), também utilizou osteocalcina e NTx entre os marcadores de remodelação óssea.

Neste estudo, verificou-se que a introdução do biscoito contendo CPS aumentou a concentração no sangue de osteocalcina em mulheres adultas, sugerindo que o CPS promoveu formação óssea, com $p=0,003$. Porém não foi verificado significativamente diminuição na reabsorção óssea entre médias observadas.

Na literatura encontramos um estudo realizado por Toba et al. (2001), em que os autores verificaram resultados significativos tanto para osteocalcina como para NTX. Estes autores trabalharam com 30 homens recebendo uma bebida experimental contendo concentrado proteico de soro de leite por 16 dias e concluíram que a proteína do soro de leite promoveu a formação óssea e suprimiu a reabsorção óssea. Outro estudo realizado por Dawson-Hughes et

al. (2004), em que comparou dois grupos de pessoas, sendo um com baixa ingestão de proteína e outro com alta ingestão, utilizando suplementos com proteína derivadas de carnes, foi observado redução nos níveis de NTX urinário, porém, para osteocalcina, os valores não diferiram significativamente, observando uma redução na taxa de reabsorção óssea no grupo de alta ingestão proteica.

A utilização de drogas voltadas ao tratamento de doenças ósseas visa bloquear a reabsorção óssea, no entanto, também diminuem a formação ou a atividade de osteoclastos. Para prevenir doenças ósseas, é questionável o bloqueio total da reabsorção óssea pois irá desequilibrar o ciclo de remodelação óssea. Existe, ainda, a necessidade de estudos referentes a importância da proteína do soro de leite na perda do balanço da remodelação óssea, devido ao efeito supressivo na reabsorção óssea, relatado por alguns autores (TOBA et al., 2000; TOBA et al., 2001).

No presente estudo, a excreção urinária de NTX (indicador bioquímico da reabsorção óssea) não se mostrou relacionada com a concentração sérica de osteocalcina (indicador bioquímico da formação óssea) antes da ingestão do biscoito, mas a excreção urinária de NTX mostrou-se relacionada a esse evento, após 16 dias de ingestão do biscoito. Esses resultados indicam que as mulheres que tiveram uma atividade maior na formação óssea, também mostraram uma maior atividade de reabsorção óssea após os 16 dias de ingestão do biscoito contendo CPS. Verifica-se com esses resultados que a ingestão do biscoito enriquecido com CPS aumentou a formação óssea, porém não bloqueou a reabsorção do mesmo, mantendo o balanço de remodelação do osso. Segundo Toba et al. (2001), a proteína do soro de leite pode manter o balanço da remodelação óssea pois contém diversos componentes efetivos para ambos, formação e reabsorção óssea.

Rapuri et al. (2003), em um estudo com mulheres na pós menopausa, concluiu que a maior ingestão de proteína (71g/dia) está associada a maior densidade mineral óssea, quando da presença de uma ingestão adequada de cálcio. Recomenda uma ingestão diária de 1g/kg de peso corporal/dia, sugerindo que idosos, que estão em maior risco de osteoporose, uma maior ingestão de proteína é importante para a manutenção de uma boa saúde dos ossos. Hannan et al. (2000) em um estudo de base populacional, mostrou que mesmo após o controle de fatores de confusão conhecidos, incluindo perda de peso e sexo, a ingestão de proteínas é um componente importante da saúde óssea em idosos, sugerindo um efeito tanto para homens como para mulheres em idade relacionada com a perda óssea. O mesmo conclui que garantir uma ingestão dietética adequada de proteínas é um componente importante para a saúde do osso.

O processo de remodelação óssea ocorre ao longo de toda a vida em ciclos repetidos de destruição e reconstrução, embora com taxas diferentes em certos momentos. Os anos críticos para a construção de massa óssea são durante a infância e a adolescência. Neste estágio, um novo osso é formado mais rapidamente do que o osso velho é removido, fazendo com que os ossos se tornem maiores e mais densos. Esse ritmo continua até em torno dos 20 anos, quando o pico de massa óssea é normalmente atingido (nível máximo de massa óssea). Em adultos jovens saudáveis, a quantidade de formação óssea aproximadamente se equilibra com a quantidade de reabsorção óssea. Conforme envelhecemos, este balanço muda em favor da reabsorção óssea, ocasionando perda do tecido ósseo. Esse processo começa geralmente após os 40 anos, quando nosso organismo não é mais capaz de substituir tão rapidamente a perda do tecido ósseo, o que pode resultar em doenças debilitantes como a osteoporose (IOF, 2006; WEAVER et al., 2001). Nas mulheres, a taxa de perda do tecido ósseo aumenta de forma substancial imediatamente após a menopausa, quando a redução da produção de estrogênio diminui a proteção do osso. Os homens após os 50 anos também sofrem perda de tecido ósseo, porém com taxas de perda mais lentas do que mulheres (IOF, 2006). Contudo, evidências crescentes mostram que a perda da massa óssea começa muito mais cedo do que a menopausa, especialmente em indivíduos sedentários (WEAVER et al., 2001).

Segundo a FAO (2013), a osteoporose está relacionada com a baixa ingestão de produtos lácteos. Em um estudo realizado por Merrill e Aldana (2009) verificou-se que taxas de reabsorção óssea aumentaram depois de apenas seis semanas de intervenção destinada a proteger a saúde do coração pelo aumento de frutas, vegetais e grãos, enquanto reduzia o consumo de carnes e lácteos.

No presente estudo, as mulheres selecionadas encontravam-se no período entre o pico de massa óssea e a menopausa, onde o osso é considerado estável. Neste estágio, a formação e reabsorção estão em níveis iguais. Com a introdução do biscoito contendo CPS, observou-se aumento da formação óssea, processo visualizado em período de rápido crescimento (infância e adolescência), o que confirma que as proteínas do soro do leite possuem componentes benéficos à saúde óssea.

Um dos possíveis mecanismos do aumento da formação óssea pode ser devido a um componente presente no CPS que é particularmente importante para o crescimento dos ossos, o fator-1, como sendo estimulante de crescimento semelhante à insulina (IGF-1). No esqueleto, o IGF-1 atua aumentando a captura de aminoácidos que são incorporados em novas proteínas e contribuem para o crescimento do osso (WILEY, 2005; WILEY, 2009). Hunt, Johnson e

Roughead (2009) em seu estudo concluíram que o aumento no IGF-1 no sangue pode indicar um efeito benéfico sobre o metabolismo ósseo.

Na fase da vida adulta, com a inclusão de medidas preventivas assegurando uma dieta contendo alimentos proteicos de elevado valor nutricional, os ossos se tornarão mais fortes e menos vulneráveis à osteoporose durante o envelhecimento, tanto para homens como para mulheres.

Em geral, considera-se que a genética controla 60 a 80% da massa óssea, enquanto fatores ambientais, como dieta e atividade física são responsáveis por 20 a 40% (BONJOUR; CHEVALLEY, 2007 apud FAO, 2013, p. 131).

Os principais fatores da dieta que afetam a massa óssea são, principalmente, cálcio e vitamina D, embora outros nutrientes como proteínas, potássio, zinco, vitaminas A, C e K, também desempenham papel importante neste processo (FAO, 2013). No biscoito desenvolvido neste estudo, verificou-se aumento significativo das quantidades proteínas, cálcio, potássio e zinco, quando comparadas a formulação padrão (Tabela 33), sugerindo que a introdução do mesmo na dieta pode proporcionar benefícios à saúde óssea.

O balanço do cálcio é determinado pela relação entre ingestão de cálcio, sua absorção e excreção. A ingestão dietética de cálcio tem de ser grande o suficiente para igualar perdas obrigatórias, evitando danos ao esqueleto. Perto de 20 a 30% do cálcio consumido na dieta é absorvido no trato gastrointestinal (THEOBALD, 2005). A quantidade absorvida depende da forma como o cálcio está presente na dieta, da quantidade presente, da solubilidade e da presença de fatores da dieta que inibem a promoção da absorção (FAO, 2013). O cálcio do leite tem uma elevada biodisponibilidade, similar ao carbonato de cálcio, que é prontamente absorvido (THEOBALD, 2005). Estudos mostram resultados controversos sobre a relação entre aumento da proteína e excreção de cálcio. O efeito negativo é considerado pelo aumento do cálcio na urina o que, conseqüentemente, aumenta a necessidade de ingestão pela dieta (FAO, 2013). Estudos utilizando proteína purificada ou hidrolisados proteicos mostram consistentemente um aumento de 1 mg de cálcio na urina para cada 1 g de proteína ingerida (RAFFERTY; HEANEY, 2008). Os mecanismos propostos incluem o efeito da carga de ácido contido nas proteínas animais, que é neutralizada pelo organismo retirando cálcio dos ossos e a complexação do cálcio nos túbulos renais por sulfatos e fosfatos liberados pelo metabolismo das proteínas (FAO; WHO, 2002). No entanto, quando a proteína tiver como origem a ingestão de laticínios, observa-se que a perda de cálcio pela urina é menos pronunciada. No presente estudo verificamos que a ingestão do biscoito contendo CPS não aumentou a excreção de cálcio na urina (Tabela 42). Isto pode sugerir que o efeito da ingestão de proteínas sobre os níveis

urinários de cálcio pode ser combatido pelo efeito hipocalciúrico do fósforo e do potássio presente nos laticínios. Estudos realizados por Hunt, Johnson e Roughead (2009) e Kerstetter et al. (2005) demonstraram que o aumento da excreção urinária de cálcio é devido a melhora na absorção intestinal do cálcio e que dietas ricas em proteínas não resultam em balanço negativo do cálcio.

Dawson-Hughes (2003) relatou que o impacto da proteína dietética no esqueleto parece ser favorável em indivíduos idosos, que adotam dietas com o teor de cálcio recomendado, mas não naqueles com baixa ingestão de cálcio. Outros autores destacam que é importante considerar estes efeitos em todos os estágios da vida (ROUGHEAD, 2003; SPENCE; WEAVER, 2003). Kerstetter, Kenny e Insogna (2011) afirmam que a proteína dietética trabalha em sinergia com o cálcio para melhorar a retenção deste mineral e o metabolismo ósseo. O biscoito desenvolvido neste estudo contém boas quantidades de proteínas e de cálcio, que podem trabalhar em sinergia, como citado acima, para melhorar o metabolismo ósseo. Resultado confirmado pelo aumento da formação óssea sem o aumento da perda urinária de cálcio.

Segundo a WHO e FAO (2003) apud FAO (2013), as pessoas precisam ter uma dieta saudável em geral que atenda à demanda de todos os nutrientes necessários para a saúde óssea. Outras recomendações sobre o estilo de vida incluem aumentar a atividade física (atividades que mantenham ou aumentem a força muscular, coordenação e o equilíbrio, como fatores determinantes da propensão a quedas, e atividades regulares de sustentação de peso por toda a vida, o que pode aumentar o pico de massa óssea na juventude e ajudar a manter a massa óssea na vida adulta), reduzir a ingestão de sódio, aumentar o consumo de frutas e vegetais, manter um peso corporal saudável, evitar fumar e limitar a ingestão de álcool.

No contexto deste estudo, novas pesquisas seriam necessárias para o desenvolvimento de biscoitos contendo estas concentrações de CPS e aveia, porém redução do teor de lipídios, com o objetivo de garantir biscoitos com melhor qualidade nutricional, desde que as características sensoriais sejam preservadas. Além disso, a utilização de CPS em biscoitos abre novas possibilidades para a aplicação em outros produtos de panificação, a fim de melhorar as opções de mercado aos consumidores, agregar valor nutricional e promover melhora no metabolismo ósseo.

5 CONCLUSÃO

O concentrado proteico de soro de leite e a aveia apresentaram potencial para o enriquecimento de biscoitos, principalmente pelas suas propriedades físicas e composição química. A formulação contendo 15% de CPS e 20% de aveia foi a que apresentou as melhores características de biscoito tipo cookie, tanto tecnologicamente como sensorialmente.

Os benefícios para a saúde óssea do biscoito contendo CPS foram confirmados pelo aumento significativo da formação óssea, sem aumento da excreção urinária de cálcio. O biscoito também apresentou proteína de alto valor nutricional e quantidades significativas de cálcio, potássio e zinco, quando comparadas a formulação padrão, sugerindo que a introdução desse produto na dieta pode proporcionar benefícios à saúde óssea.

Os resultados da pesquisa são bastante promissores para o aproveitamento do soro de leite, através da utilização como concentrado proteico de soro de leite, no enriquecimento de biscoitos, já que estes, normalmente, apresentam baixo teor de proteínas e minerais.

REFERÊNCIAS

ABDUL-HAMID, A.; LUAN Y.S. Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran. **Food Chemistry**, v. 68, p.15-19, 2000.

ABIQ. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Mercado de queijos cresce no país e atrai estrangeiros**. 2014. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/imprensa_press.asp?codigo_categoria=2&codigo_subcategoria=16&ano=2014>. Acesso em: 15 jan. 2016.

AIMUTIS, W. R. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. **The Journal of Nutrition**. American Society for Nutritional Sciences, 2004.

AKESON, W.R.; STAHMANN, M.A. A Pepsin Pancreatin Digest Index of Protein Quality Evaluation. **The Journal of Nutrition**, v. 83, 1964.

ALMEIDA, C.C.; MONTEIRO, M.L.G.; COSTA-LIMA, B.R.C.; ALVARES, T.S. In vitro digestibility of commercial whey protein supplements. **Food Science and Technology**, v. 61, p. 7-11, 2015.

ALVES, M.P.; MOREIRA, R.O.; JUNIOR, P.H.R.; MARTINS, M.C.F.; PERRONE, I.T.; CARVALHO, A.F. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS - AACC. **Approved methods**. 9 ed. Saint Paul: AACC, 2010.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION – ADA. Position of the American Dietetic Association: Health Implications of Dietary Fiber. **J Am Diet Assoc.**, v. 108, p. 1716-1731, 2008.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteína do soro de leite bovino**. 1ª edição. São Paulo: Editora Manole, 2003.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Method 991.43, v.2, 2007.

ASSIS, L. M. et al. Propriedades nutricionais, tecnológicas e sensoriais de biscoitos com substituição de farinha de trigo por farinha de aveia ou farinha de arroz parboilizado. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 15-24, 2009.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE BISCOITOS - ANIB. Dados Estatísticos: **Mercado Brasileiro de Biscoitos**. Disponível em: http://www.anib.com.br/dados_estatisticos.asp. Acesso em: 30 out. 2014.

ATRA, R.; VATAI, G., BEKASSY-MOLNAR, E.; BALINT, A. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 325–332, 2005.

BABICZ-ZIELINSKA, E. Food preferences among the Polish young adults. **Food Quality and Preference**, v.10, p.139-145, 1999.

BALDASSO, C.; BARROS, T.C.; TESSARO, I.C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381-386, 2011.

BARBOSA, A. S.; ARAÚJO, A. S.; FLORÊNCIO, I. M.; BEZERRA, R. R. A.; FLORENTINO, E. R. Estudo cinético da fermentação do soro de queijo de coalho para produção de aguardente. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 5, p. 237-254, 2010.

BAUMAN, D. E. et al. Major advances associated with the biosynthesis of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1235-1243, 2006.

BAXTER, I; ROGERS, A.; EASTELL, R.; PEEL, N. Evaluation of urinary N-telopeptide of type I collagen measurements in the management of osteoporosis in clinical practice. **Osteoporos Int**. v.24, p.941-7, 2013.

BERGARA-ALMEIDA, S.; SILVA, M.A.A.P. Hedonic scale with reference: performance in obtaining predictive models. **Food Quality and Preference**, v.13, p.57–64, 2002.

BORGES, P.F.Z. et al. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.4, n. 411, p.1-8, 2001.

BOX, G. P.; DRAPER, N. R. **Empirical Model-Building and Response Surfaces**. New York: J. Wiley; Sons, 1987. 669 p

BRANS, G. **Design of membrane systems for fractionation of particle suspensions**. PhD. Thesis, Wageningen University, The Netherlands, 2006.

BRANS, G. et al. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **J. Memb. Sci., Amsterdam**, v. 243, p.263-272, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em Conformidade com o Anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2006.

_____. Ministério da Saúde. Portaria n° 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes), constantes do anexo desta Portaria. **Diário Oficial da União: Poder Executivo**, 1998.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2011.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 360 de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre o regulamento técnico de rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2003.

_____. Ministério da Saúde. Agência nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA. Resolução RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2001.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 263, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2005.

BRIÃO, V. B., TAVARES, C. R. G. Pore Blocking Mechanism for the recovery of milk solids from dairy wastewater by ultrafiltration. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 2, p. 393-407, 2012.

_____. Ultrafiltração como processo de tratamento para o reuso de efluentes de laticínios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 134-138, 2007.
CONFORTI, P.A.; LUPANO, C.E. Functional properties of biscuits with whey protein concentrate and honey. **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, p.745 – 753, 2004.

COSTA, A.M.N.M.; CHAVES, C.G.; FREITAS, R.M.F.; ROCHA, E.M.F.F.; MOURA, L.B.; MARQUES, F.L.; COSTA, T.L.; MOURA, R.L. Elaboração de doce de leite pastoso com diferentes concentrações de soro de leite. **In: Jornada Nacional da Agroindústria, Bananeiras, 2008. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.45, p. 385-404, 2005.

CROGUENNEC, T.; RENAULT, A.; BOUHALLAB, S.; PEZENNEC, S. Interfacial and foaming properties of sulfhydrylmodified bovine β lactoglobulin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 302, n. 1, p. 32-39, 2006.

CRONIN, K.; PREIS, C. A statistical analysis of biscuit physical properties as affected by baking. **Journal of Food Engineering**, v. 46, n.4, p. 217–225, 2000.

CWATTERS, K.H.; OUEDRAOGO, J.B.; RESURRECCION, V.A.; HUNG, Y.-C.; PHILLIPS, R.D. Physical and sensory characteristics of sugar cookies containing mixtures of wheat, fonio (*Digitaria exilis*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) flours. **International Journal of Food Science and Technology**, v.38, p.403 – 410, 2003.

DAI, Z.; WANG, R.; ANG, L.W.; YUAN, J.M.; KOH, W.P. Bone turnover biomarkers and risk of osteoporotic hip fracture in an Asian population. **Bone**, v. 83, p.171-177, 2016.

DARRAGH, A., HODGKINSON, S.M. Quantifying the Digestibility of Dietary Protein. **The Journal of Nutrition**, v.130, p. 1850-1856, 2000.

DAWSON-HUGHES, B. Interaction of dietary calcium and protein in bone health in humans. **The Journal of Nutrition**, v.133, n.3, p. 852-854, 2003.

DAWSON-HUGHES, B.; HARRIS, S.S.; RASMUSSEN, H.; SONG, L.; DALLAL, G.E. Effect of dietary protein supplements on calcium excretion in healthy older men and women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, p. 1169-1173, 2004.

DEGLAIRE, A.; BOS, C.; TOME, D.; MOUGHAN, P.J. Ileal digestibility of dietary protein in the growing pig and adult human. **British Journal of Nutrition**, v.102, p. 1752–1759, 2009.

DELMAS, P. D. et al. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. **Osteoporosis Int.**, v. 6, p.2-17, 2000.

DUANGMAL, K.; SAICHEUA, B.; SUEEPRASAN, S. Colour evaluation of freeze-fried roselle extract as a natural food colorant in a model system of a drink. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.41, p. 1437 – 1445, 2008.

DUMAIS, R. et al. Queso. In: AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la leche**. Zaragoza Ed. Acribia, S.A., 1991. p. 249-296.

EDUARDO, M. F.; LANNES, S. C. S. Achocolatados: análise química. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n.3, p. 405-412, 2004.

EL-DASH, A.; GERMANI, R. (Eds.). **Tecnologia de farinhas mistas**: uso de farinhas mistas na produção de biscoitos. Brasília: EMBRAPA-SPI, v. 6, p. 47, 1994.

ERIKSEN, E. K., HALVOR, H., JENSEN, E., RAGNHILD, A., TOVE, G. D., JACOBSEN, M., ET AL. (2010). Different digestion of caprine whey proteins by human and porcine gastrointestinal enzymes. *British Journal of Nutrition*, 104, 374e381.

ESTELLER, M. S. **Fabricação de pães com reduzido teor calórico e modificações reológicas ocorridas durante o armazenamento**. 2004. 238 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica), Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2004.

ESTELLER, M. S.; LANNES, S. C. S. Parâmetros complementares para fixação de identidade e qualidade de produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 802-806, 2005.

ETZEL, M. R. Manufacture and use of dairy protein fractions. **The Journal of Nutrition**. American Society for Nutritional Sciences, 2004.

FAO. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. **Leite e produtos lácteos na nutrição humana**. Roma, 2013.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Protein quality evaluation. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. **FAO Food and Nutrition Paper**. Roma: FAO, 1991.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Protein quality evaluation. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. **FAO Food and Nutrition Paper**. Roma: FAO, 1991.

FAO/WHO. **Human vitamin and mineral requirements**. Report of a joint FAO and WHO expert consultation. Rome. 2002. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/004/Y2809E/y2809e00.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

FASOLIN, L. H. et al. Biscoitos produzidos com farinha de banana: avaliações química, física e sensorial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 3, p 524-529, jul.-set. 2007.

FASSIO, L.O.; TÉRAN-ORTIZ, G.P.; ARAÚJO, R.A.B.M.; MENDONÇA, A.M.B. Caracterização sensorial e físico-química de gelados comestíveis a base de soro de leite adicionado de polpas de frutos do cerrado. **In: Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG, Bambuí, 2009.**

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas.** Lavras: UFLA, 2000. 66 p.

FOOD AND NUTRITION BOARD. Institute of Medicine. DRI. Dietary References Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (Macronutrients). Washington DC: The National Academies Press, 2005.

FOSTER, K. F.; LUKASKY, H. C. Whole – BODY IMPEDANCE. What does it measure? *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 64, p. 388, 1996.

FRIGON, J. C.; BRETON, J.; BRUNEAU, T.; MOLETTA, R.; GUIOT, S. R. The treatment of cheese whey wastewater by sequential anaerobic and aerobic steps in a single digester at pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4156-4163, 2009.

GAINES, C. S. Collaborative studies on the baking quality of cookie flour by wire-cut type formulations (AACC methods 10-53 and 10-54). **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 38, n. 1, p. 26-30, 1993.

GALLAGHER, E.; KENNY, S.; ARENDT, E.K. Impact of dairy protein powders on biscuit quality. **European Food Research and Technology**, v.221, p.237 – 243, 2005.

GARNERO, P.; DELMAS, P. D. Biochemical markers of bone turnover - Applications for Osteoporosis. **Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.**, v. 27, p. 303-323, 1998.

GRANDI, J. G. Leite fermentado, manteiga e queijo. In: AQUARONE, Eugênio (Coord.) **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação.** São Paulo. Editora Edgar Blucher Ltda., v. 5 p.123-143, 1983.

GRIGELMO-MIGUEL, N.; GORINSTEIN, S.; MARTIN-BELLOSO, O. Characterisation of peach dietary fibre concentrate as a food ingredient. **Food Chemistry**, v.65, p.175–181, 1999.

GRUNERT, K.G.; BECH-LARSEN, T.; BREDAHL, L. Three issues in consumer quality perception and acceptance of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 575-584, 2000.

GUAÑABENS, N.; PERIS, P.; MONEGAL, A. Bone turnover markers: a clinical review. **Clinic. Rev. Bone Miner. Metab.**, v.13, p.83-97, 2015.

GUERRERO, L.; COLOMER, Y.; GUÀRDIA, M.D.; XICOLA, J.; CLOTET, R. Consumer attitude towards store brands. **Food Quality and Preference**, v.11, p.387-395, 2000.

GUIMARÃES, P. M. R., TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 375-384, 2010.

GUTKOSKI, L. C.; BONAMIGO, J. M. A.; TEIXEIRA, D. M. F.; PEDÓ, I. Desenvolvimento de barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 355-363, 2007.

GUTKOSKI, L. C.; IANISKI, F.; DAMO, T. V.; PEDÓ, I. Biscoitos de aveia tipo "cookie" enriquecidos com concentrado de β -glicanas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 104-110, 2007.

GUTKOSKI, L. C.; NODARI, M. L.; NETO, R. J. Avaliação de farinhas de trigos cultivados no Rio Grande do Sul na produção de biscoitos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 91-97, 2003.

GUTKOSKI, L. C.; PEDÓ, I. **Aveia**: composição química, valor nutricional e processamento. São Paulo: Varela, 2000. 96p.

HA, E.; ZEMEL, M. B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review). **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 251-258, 2003.

HANNAN, M. T.; TUCKER, K.L.; DAWSON-HUGHES, B.; CUPPLES, L.A.; FELSON, D.T.; KIEL, D.P. Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: The Framingham Osteoporosis Study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, p. 2504-2512, 2000.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

HEANEY, R.P.; MCCARRON, D.A.; DAWSON-HUGHES, B., et al. Dietary changes favorably affect bone remodeling in older adults. **Journal of the American Dietetic Association**, v.99, p.1228-33, 1999.

HEKMAT, S.; REID, G. Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. **Nutrition Research**, v. 26, p. 163-166, 2006.

HERRERO, A.M.; ORDÓÑEZ, J.A.; AVILA, R.; HERRANZ, B.; DE LA HOZ, L.; CAMBERO, M.I. Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. **Meat Science**, v.77, p.331-338, 2007.

HESHMATI, H. M. et al. Effects of the circadian variation in serum cortisol on markers of bone turnover and calcium homeostasis in normal postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.**, v. 83, p. 751-757, 1998.

HUFFMAN, L. M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technol.**, v. 50, p. 49-52, 1996.

HUNT, J.R.; JOHNSON, L.K.; ROUGHEAD, Z.K.F. Dietary protein and calcium interact to influence calcium retention: a controlled feeding study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.89, p.1357-65, 2009.

HYUN, T.H., BARRETT-CONNOR, E.; MILENE, D.B. Zinc intakes and plasma concentrations in men with osteoporosis: the Rancho Bernardo Study. **Am J Clin Nutr**, v. 80, p. 715-21, 2004.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária. Junho de 2015. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201501_publ_completa.pdf. Acesso em: 10 fev. 2016.

INSTITUTE OF MEDICINE. DRI. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washington (DC): National Academy Press; 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>>. Acesso em: 16 jan. 2016.

INSTITUTE OF MEDICINE. DRI. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington (DC): National Academy Press; 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>>. Acesso em: 16 jan. 2016.

INSTITUTE OF MEDICINE. DRI. Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulfate. Washington (DC): National Academy Press; 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>>. Acesso em: 16 jan. 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 1ª ed. Digital, 2008.

INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION - IOF. **Invest in your bones.** Bone Appétit – The role of food and nutrition in building and maintaining strong bones. 2006. Disponível em: <http://www.iofbonehealth.org/publications/bone-appetit.html>. Acesso em: 30 out. 2014.

IOM report on calcium and vitamina D. In: Medicine Io, editor. Washington, DC. Disponível em: <http://www.iom.edu/vitaminD>, 2010. Acesso em: 09 nov. 2014.

ISO 1871-2009. **Food and feed products.** General guidelines for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method.

KATSANOS, C. et al. Whey protein ingestion in elderly persons results in greater muscle protein accrual than ingestion of its constituent essential amino acid content. **Nutrition Research**, v. 28, p. 651–658, 2008.

KELLEHER, S. L.; CHATTERTON, D.; NIELSEN, K. LONNERDAL, B. Glycomacropéptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. **Am J Clin Nutr.**, v. 77, p. 1261–1268, 2003.

KERSTETTER, J. E.; O'BRIEN, K.O.; CASERIA, D.M.; WALL, D.E.; INSOGNA, K.L. The impact of dietary protein on calcium absorption and kinetic measures of bone turnover in women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, p. 26-31, 2005.

KERSTETTER, J.E.; KENNYB, A.M.; INSOGNAC, K.L. Dietary protein and skeletal health: a review of recent human research. **Nutrition and metabolism**, v.22, p. 16-20, 2011.

KIM, D.; THOMA, G.; NUTTER, D.; MILANI, F.; ULRICH, R.; NORRIS, G. Life cycle assessment of cheese and whey production in the USA. **Int J Life Cycle Assess**, v. 18, p. 1019–1035, 2013.

KISSEL, L. T.; PRENTICE, N.; YAMAZAKI, W. T. Protein enrichment of cookie flours with wheat gluten and soy flour derivatives. **Cereal Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 638-649, 1975.

KWANSA, A.L.; DE VITA, R.; FREEMAN, J.W. Mechanical recruitment of N and C crosslinks in collagen type I. **Matrix Biol**, v.34, p. 161-9, 2014.

LARRAURI, J.A. New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 3-8, 1999.

LAYMAN, D. K. Dietary Guidelines should reflect new understandings about adult protein needs. **Nutr Metabol**, v. 12, n. 6, 2009.

LEE, A. J.; HODGES, J. S.; EASTELL, R. Measurement of osteocalcin. **Am. Clin. Biochem.**, v. 37, p. 432-446, 2000.

LEE, K.-A.; BRENNAND, C.P. Physico-chemical, textural and sensory properties of a fried cookie system containing soy protein isolate. **International Journal of Food Science and Technology**, v.40, p.501 – 508, 2005.

LEÓN, K.; MARY, D.; PEDRESCHI, F.; LEÓN, J. Color measurement in $L^* a^* b^*$ units from RGB digital images. **Food Research International**, v.39, p.1084 – 1091, 2006.

LIRA, H. L.; SILVA, M. C. D.; VASCONCELOS, M. R. S.; LIRA, H. L.; LOPEZ, A. M. Q. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 33-37, 2009.

LOMBARDI, G.; LANTERI, P.; COLOMBINI, A.; BANFI, G. Blood biochemical markers of bone turnover: pre-analytical and technical aspects of sample collection and handling. **Clin Chem Lab Med**, v.50, p. 771-89, 2012.

LONNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **Am J Clin Nutr**, v. 77, p. 1537-1543, 2003.

MADRONA, G.S.; ZOTARELLI, M.F.; BERGAMASCO, R. Estudo do efeito da adição de soro de queijo na qualidade microbiológica do doce de leite pastoso. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.2, p.81-86, 2008.

MAHAJAN, S. S.; GODDIK, L.; QIAN, M.C. Aroma Compounds in Sweet Whey Powder. **Journal Dairy Science**. v. 87 p. 4057–4063, 2004.

MANOHAR, R.S.; RAO, P.H. Effect of mixing method on the rheological characteristics of biscuit dough and the quality of biscuits. **European Food Research and Technology**, v. 210, p.43 – 48, 1999.

MARETI, M. C.; GROSSMANN, M. V. E.; BENASSI, M. T. Características físicas e sensoriais de biscoitos com farinha de soja e farelo de aveia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 878-883, 2010.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**, v. 9, n. 2, p. 136-156, 2004.

MAURO, A.K.; SILVA, V.L.M.; FREITAS, M.C.J. Caracterização física, química e sensorial de *cookies* confeccionados com Farinha de Talo de Couve (FTC) e Farinha de Talo de Espinafre (FTE) ricas em fibra alimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 719-728, 2010.

MCEWAN, J. A.; SHARP, T.M. Technical economic and consumer barriers to the consumption of reduced fat bakery products. **Nutrition and Food Science**, v. 30, n. 1, 2000.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

MENDOZA, F.; AGUILERA, J.M. Application of image analysis for classification of ripening bananas. **Journal of Food Science**, v.69, p. 471 – 477, 2004.

MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. **Journal of Food Engineering**, v.56, p.181–188, 2003.

MERRILL, R.M.; ALDANA, S.G. Consequences of a plant-based diet with low dairy consumption on intake of bone-relevant nutrients. **Journal of Women's Health**, v.18, p.1-8, 2009.

METSÄMUURONEN, S.; NYSTYÖM, M. Enrichment of α lactalbumin from diluted whey with polymeric ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 337, n. 1-2, p. 248-256, 2009.

MORENO, Y. M. F. **Influência das proteínas do soro de leite bovino no estado nutricional, composição corporal e sistema imune em coorte de crianças com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)**. 2002. 120f. Dissertação. (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

MORIN, P.; BRITTEN, M.; JIMENEZ-FLORES, R.; POULIOT Y. Microfiltration of Buttermilk and Washed Cream Buttermilk for Concentration of Milk Fat Globule Membrane Components. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 5, 2007.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **National Research Council**. Recommended Dietary Allowances (RDA). 10th Edition. Washington, 1989.

ONWULATA, C. I.; KONSTANCE, R. P.; TOMASULA, P. M. Minimizing variations in functionality of whey protein concentrates from different sources. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 749-756, 2004.

PAGNO, C. H.; BALDASSO, C.; TESSARO, I.C.; FLORES, S.H.; JONG, E.V. Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.2, p. 231-239, 2009.

PARK, Y.W. Rheological characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v.68, p.73 – 87, 2007.

PEREZ, P. M. P.; GERMANI, R. Elaboração de biscoitos tipo salgado, com alto teor de fibra alimentar, utilizando farinha de berinjela (*Solanum melongena*, L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 1, p. 186-192, 2007.

PÉREZ, S. et al. Effect of soy flour and whey protein concentrate on cookie color. **Food Science and Technology**, v. 50, p. 120-125, 2013.

PETERS, B. S. E.; MARTINI, L. A. Nutritional aspects of the prevention and treatment of osteoporosis. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 54, n. 2, 2010.

PIGGOTT, J. R.; SIMPSON, S. J.; WILLIAMS, S. A. R. Sensory analysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 33, p. 7-18, 1998.

PIRES, C.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; ROSA, J.C.; COSTA, N.M.B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.1, p. 179-187, 2006.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.

PROMISLOW, J. H. E.; GOODMAN-GRUEN, D.; SLYMEN, D. J.; BARRETT-CONNOR, E. Protein consumption and bone mineral density in the elderly. **Am J Epidemiol.**, v. 155, n. 7, 2002.

QUACH, M.L.; CHEN, X.D.; STEVENSON, R.J. Headspace sampling of whey protein concentrate solutions using solid-phase microextraction. **Food Res. Int.**, v. 31, p.371-379, 1999.

RAFFERTY, K.; HEANEY, R.P. Nutrient effect on the calcium economy: emphasizing the potassium controversy. **The Journal of Nutrition**, v.138, p.166-171, 2008.

RAGHAVENDRA, S.N.; RASTOGI, N.K. RAGHAVARAO, K.S.M.S.; THARANATHAN, R.N. Dietary fiber from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties. **European Food Research Technology**, v.218, n.6, p.563-567, 2004.

RAPURI, P. B.; GALLAGHER, J. C.; HAYNATZKA, V. Protein intake: effects on bone mineral density and the rate of bone loss in elderly women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 77, p. 1517-1525, 2003.

REZAEI, H.; ASHTIANI, F.; FOULADITAJAR, A. Effects of operating parameters on fouling mechanism and membrane flux in crossflow microfiltration of whey. **Desalination**, v. 274, n. 1-3, p. 262-271, 2011.

RICHARDS, N. S. P.S. Emprego racional do soro láctico. **Indústria de Laticínios**. mai/jun, p. 67-69, 1997.

RIZZOLI, R.; BONJOUR, J.P. Dietary protein and bone health. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.19, p.527-531, 2004.

RODRIGUEZ, R.; JIMÉNEZ, A.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.F.; GUILLE, R.; HEREDIA, A. Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 3-15, 2006.

ROUGHEAD, Z.K.F. Is the interaction between dietary protein and calcium destructive or constructive for bone? **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 866-869, 2003.

SARAIVA, G.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n 1, 2002.

SCHAAFSMA, G. Advantages and limitations of the protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) as a method for evaluating protein quality in human diets. **British Journal of Nutrition**, v.108, p. 333-336, 2012.

SEABRA, L. M. J.; ZAPATA, J. F. F.; NOGUEIRA, C. M.; DANTAS, M. A.; ALMEIDA, R. B. Fécula de mandioca e farinha de aveia como substitutos de gordura na formulação de hambúrguer de carne ovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 245-248, 2002.

SEIBEL, M. J. Biochemical markers of bone turnover. Part I: Biochemistry and Variability. **Clin. Biochem. Rev.**, v. 26, 2005.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SILVA, A.C.C.; FROTA, K.M.G.; ARÊAS, J.A.G. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes: proteína. **International Life Sciences Institute do Brasil**. ISLI Brasil. São Paulo: 2012.

SILVA, A.C.C.; FROTA, K.M.G.; ARÊAS, J.A.G. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes: proteína. **International Life Sciences Institute do Brasil**. ISLI Brasil. São Paulo: 2012.

SILVA, K.; BOLINI, H.M.A.; ANTUNES, A.J. Soro de leite bovino em sorvete. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 187-196, 2004.

SILVA, M. R. et al. Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 176-182, 2001.

SINDAYIKENGERA, S.; WEN-SHUI, X. Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 7, p.90-98, 2006.

SINGH, J.; SINGH, N.; SHARMA, T.R.; SAXENA, S.K. Physicochemical, rheological and cookie making properties of corn and potato flours. **Food Chemistry**, v.83, p.387 – 393, 2003.

SPENCE, L.A.; WEAVER, C.M. New perspectives on dietary protein and bone health: Preface. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 850-851, 2003.

SUDHA M.L.; A.K. SRIVASTAVA, A. K.; VETRIMANI, R.; LEELAVATHI, K. Fat replacement in soft dough biscuits: Its implications on dough rheology and biscuit quality. **Journal of Food Engineering**. v. 80, p. 922–930, 2007.

TAKADA, Y.; AOE, S.; KUMEGAWA, M. Whey protein stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 223, p. 445–449, 1996.

THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebióticos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.

THEBAUDIN, J.Y.; LEFEBVRE, A.C.; HARRINGTON, M.; BOURGEOIS, C.M. Dietary fibres: nutritional and technological interest. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p.41-48, 1997.

THEOBALD, H.E. Dietary calcium and health. *Brit. The Journal of Nutrition*, v.30, p.237-277, 2005.

TOBA, Y. et al. Milk basic protein promotes bone formation and suppresses bone resorption in healthy adult men. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 65, n. 6, p. 1353-1357, 2001.

TOBA, Y. et al. Milk basic protein: a novel protective function of milk against osteoporosis. **Bone**, v.27, n.3, p.403-408, 2000.

URALA, N.; LÄHTEENMÄKI, L. Consumers – changing attitudes towards functional foods. **Food Quality and Preference**, v.18, p.1-12, 2007.

VASIKARAN, S.; EASTELL, R.; BRUYE`RE, O.; FOLDES, A.J.; GARNERO, P.; GRIESMACHER, A. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int.*, v. 22, p. 391-420, 2011;22:391–420.

VERBEKE, W. Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for health? **Food Quality and Preference**, v. 17, 126–131, 2006.

VILLEMEJANE, C.; ROUSSEL, P.; BERLAND, S.; AYMARD, P.; MICHON, C. Technological and sensory tools to characterize the consistency and performance of fibre-enriched biscuit doughs. **Journal of Cereal Science**. v. 57, p. 551-559, 2013.

VORAGEN, A. G. J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, p. 328-335, 1998.

WEAVER, C.M. et al. Impact of exercise on bone health and contraindication of oral contraceptive use in young women. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.33, n.6, p. 873-880, 2001.

WEBER, F. H.; GUTKOSKI, L. C.; ELIAS, M. C. Caracterização química de cariopses de aveia (*Avena sativa L*) da cultivar UPF 18. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2002.

WILEY, A.S. Consumption of milk but not other dairy products, is associated with height among US preschool children in NHANES 1999-2002. **American Journal of Human Biology**, v,36, n.2, p.125-138, 2009.

WILEY, A.S. Does milk make children grow? Relationships between milk consumption and height in NHANES 1999-2002. **American Journal of Human Biology**, v,17, p.425-441, 2005.

WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Jounal Dairy Science**. v. 81, p. 597-608, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**: Report of a WHO consultation on obesity. (WHO Technical Report Series n. 894). Geneva. Switzerland: WHO, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Physical Status**: the use and interpretation of anthropometry. (WHO Technical Report Series n. 894). Geneva. Switzerland: WHO, 1995.

ZAVAREZE, E.R.; MOARES, K.S.; SALAS-MELLADO, M.L.M. Qualidade tecnológica e sensorial de bolos elaborados com soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.100-105, 2010.

ZOULIAS, E. I.; OREOPOULOU, V.; KOUNALAKI, E. Effect of fat and sugar replacement on cookie properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 14, p. 1637-1644, 2002.

ZOULIAS, E. I.; PIKNIS, S.; OREOPOULOU, V. Effect of sugar replacement by polyols and acesulfame-K on properties of low-fat cookies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 14, p. 2049-2056, 2000.

APÊNDICE A**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS
TESTES DE ANÁLISE SENSORIAL**



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa **“Desenvolvimento de biscoito tipo cookie, com baixo teor de lactose, enriquecido com concentrado proteico de soro de leite”**, de responsabilidade dos pesquisadores Telma Elita Bertolin e Graziela De Carli.

Esta pesquisa justifica-se devido necessidade da indústria alimentícia para desenvolvimento de novos produtos com baixo teor de lactose, com ênfase no mercado de biscoitos e no interesse dos consumidores por produtos que apresentem elevado valor nutricional e benefícios à saúde humana. Os objetivos desta pesquisa são de desenvolver um biscoito tipo cookie com baixo teor de lactose, enriquecido com concentrado proteico de soro de leite e avaliar as características físicas, químicas e nutricionais.

A sua participação na pesquisa será em 1 encontro, a ser combinado, com duração aproximada de 1 hora ou *in home* e consiste em realizar avaliação sensorial de amostras de biscoitos. Será solicitado que você deguste o produto e avalie a preferência e aceitabilidade global, conforme escalas apropriadas. Você não deverá sentir desconforto, mas o (a) pesquisador (a) compromete-se em orientá-lo (a) e encaminhá-lo (a) para os profissionais especializados conforme necessidade. Os biscoitos desenvolvidos não oferecem riscos ao consumidor, pois foram avaliados quanto à presença de lactose.

Ao participar da pesquisa, você terá benefícios de contribuir com estudos na área de alimentação. Você terá a garantia de receber esclarecimentos sobre qualquer dúvida relacionada a pesquisa e poderá ter acesso aos seus dados em qualquer etapa do estudo. Sua participação nessa pesquisa não é obrigatória e você pode desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, caso seja de seu interesse. Caso tenha alguma despesa relacionada à pesquisa, você terá o direito de ser ressarcido (a) e você não receberá pagamento pela sua participação no estudo. As suas informações serão gravadas e posteriormente destruídas. Os dados relacionados

à sua identificação não serão divulgados. Os resultados da pesquisa serão divulgados em periódicos, mas você terá a garantia do sigilo e da confidencialidade dos dados.

Caso você tenha dúvidas sobre o comportamento dos pesquisadores ou sobre as mudanças ocorridas na pesquisa que não constam no TCLE, e caso se considera prejudicado (a) na sua dignidade e autonomia, você pode entrar em contato com os pesquisadores, Telma Elita Bertolin, pelo telefone (54) 3316 8193 e Graziela De Carli, pelo telefone (54) 3316-8310, no Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, ou também pode consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UPF, pelo telefone (54) 3316-8370 no horário das 08h às 12h e das 13h30min às 17h30min, de segunda a sexta feira.

Dessa forma, se você concorda em participar da pesquisa como consta nas explicações e orientações acima, coloque se nome no local indicado abaixo.

Desde já, agradecemos a sua colaboração e solicitamos a sua assinatura de autorização neste termo, que será também assinado pelo pesquisador responsável em duas vias, sendo que uma ficará com você e outra com o (a) pesquisador (a).

Passo Fundo, ____ de _____ de 2015.

Nome do (a) participante: _____

Assinatura: _____

Nome do (a) pesquisador (a): _____

Assinatura: _____

APÊNDICE B

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O
ESTUDO CLÍNICO**



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa **“Cookie enriquecido com concentrado proteico de soro de leite e aveia e seu efeito na formação e reabsorção óssea”**, de responsabilidade dos pesquisadores Telma Elita Bertolin e Graziela De Carli.

Esta pesquisa justifica-se devido à necessidade de alternativas para evitar a mineralização óssea inadequada, frequente em pessoas intolerantes à lactose, devido a falta da lactose na dieta e a diminuição da ingestão de produtos fontes de cálcio. A nutrição desempenha um papel fundamental neste processo por seu efeito sobre todos os fatores relacionados à fragilidade óssea, principalmente no desenvolvimento e na manutenção da massa óssea.

Os objetivos desta pesquisa são de avaliar o efeito da ingestão de biscoito tipo cookie sem lactose, enriquecidos com concentrado proteico de soro de leite bovino e aveia nos parâmetros nutricionais e na formação e reabsorção óssea de intolerantes à lactose, visando melhorar o estado nutricional e estimular o desenvolvimento ósseo.

A sua participação na pesquisa será em 3 encontros, a serem realizados no mês de outubro, em data a ser combinada previamente, com duração aproximada de 2 horas, e consiste em:

Primeiro encontro:

- Reunião inicial
- Fornecimento de informações referentes à ingestão alimentar e dados socioeconômicos e demográficos – local: Instituto de Ciências Biológicas da UPF;

Segundo encontro:

- Exames antropométricos (peso, altura, bioimpedância elétrica) – local: Instituto de Ciências Biológicas da UPF.
- Exames de sangue – local: Laboratório de Análises Clínicas Escola (LABE), do Curso de Farmácia da UPF;

- Exames de urina – local: Laboratório de Análises Clínicas Escola (LABE), do Curso de Farmácia da UPF;

Terceiro encontro:

- Exames de sangue – local: Laboratório de Análises Clínicas Escola (LABE), do Curso de Farmácia da UPF;

- Exames de urina – local: Laboratório de Análises Clínicas Escola (LABE), do Curso de Farmácia da UPF;

- Exames antropométricos (peso e bioimpedância elétrica) – local: Instituto de Ciências Biológicas da UPF.

Você não deverá sentir desconforto, mas o (a) pesquisador (a) compromete-se em orientá-lo (a) e encaminhá-lo (a) para os profissionais especializados conforme necessidade. Os biscoitos desenvolvidos não oferecem riscos às pessoas intolerantes à lactose, pois serão avaliados quanto à presença de lactose, através de análise laboratorial, seguindo a Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998, que estabelece que o produto pode conter, no máximo, 0,5 g do nutriente em referência, por 100 g ou 100 mL do produto final a ser consumido.

Ao participar da pesquisa, você terá benefícios de contribuir com estudos na área de alimentação. Você terá a garantia de receber esclarecimentos sobre qualquer dúvida relacionada a pesquisa e poderá ter acesso aos seus dados em qualquer etapa do estudo. Sua participação nessa pesquisa não é obrigatória e você pode desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, caso seja de seu interesse. Caso tenha alguma despesa relacionada à pesquisa (deslocamento), você terá o direito de ser ressarcido (a) e você não receberá pagamento pela sua participação no estudo. As suas informações serão gravadas e posteriormente destruídas. Os dados relacionados à sua identificação não serão divulgados. Os resultados da pesquisa serão divulgados em periódicos, mas você terá a garantia do sigilo e da confidencialidade dos dados.

Caso você tenha dúvidas sobre o comportamento dos pesquisadores ou sobre as mudanças ocorridas na pesquisa que não constam no TCLE, e caso se considera prejudicado (a) na sua dignidade e autonomia, você pode entrar em contato com os pesquisadores, Telma Elita Bertolin, pelo telefone (54) 3316 8193 e Graziela De Carli, pelo telefone (54) 3316-8310, no Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, ou também pode consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UPF, pelo telefone (54) 3316-8157 no horário das 08h às 12h e das 13h30min às 17h30min, de segunda a sexta feira.

Dessa forma, se você concorda em participar da pesquisa como consta nas explicações e orientações acima, coloque seu nome no local indicado abaixo.

Desde já, agradecemos a sua colaboração e solicitamos a sua assinatura de autorização neste termo, que será também assinado pelo pesquisador responsável em duas vias, sendo que uma ficará com você e outra com o (a) pesquisador (a).

Passo Fundo, ____ de _____ de 2015.

Nome do (a) participante: _____

Assinatura: _____

Nome do (a) pesquisador (a): _____

Assinatura: _____

APÊNDICE C**QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS SOCIOECONÔMICOS E
DEMOGRÁFICOS DOS CONSUMIDORES PARTICIPANTES DA
ANÁLISE SENSORIAL**



O questionário abaixo faz parte de uma pesquisa de mestrado da UPF. Para preencher o questionário, marque um X no parênteses que corresponde a sua resposta. Os dados pessoais não serão divulgados. **Muito obrigada pela compreensão e participação na pesquisa!**

Para participar desta análise sensorial, você não pode ser portador de intolerância à lactose, diabetes ou alergia e/ou intolerância a algum dos ingredientes utilizados na formulação dos biscoitos (farinha de trigo, aveia, açúcar, sal, concentrado proteico de soro de leite, gordura vegetal, fermento químico).

PESQUISA – COOKIE ENRIQUECIDO COM CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE E AVEIA

Nome: _____

1. Qual seu sexo: (1) Masculino (2) Feminino
2. Qual é sua raça/cor: (1) Branca (2) Parda (3) Negra (4) Amarela
3. Qual é seu estado civil? (1)Solteiro (2)Casado (3) Divorciado/Separado (4)União estável
4. Qual é sua idade? __ anos
5. Qual é sua escolaridade? (1) Fundamental incompleto (2) Fundamental completo (3) Médio incompleto (4) Médio completo (5) Superior incompleto (6) Superior completo (7) Pós-graduação
6. Você consumiu biscoitos ou bolachas no último mês? (1) Sim (2) Não
7. Se sim, com que frequência você consumiu biscoitos ou bolachas no último mês?
(1) todos os dias (2) de duas a três vezes por semana (3) uma vez por semana (4) quinzenal (5) uma vez no mês

8. Marque qual(is) o(s) tipo(s) de biscoito ou bolacha você consome?

Tipo de biscoito ou bolacha	SIM	NÃO
Integral	(1)	(2)
Doce	(1)	(2)
Salgado	(1)	(2)
Com aveia	(1)	(2)

9. Indique onde você consome biscoitos:

(1) Em casa (2) Em viagens (3) Em lanchonetes/restaurantes (4) No trabalho/faculdade

(5) Outros _____

APÊNDICE D

**FICHA PARA AVALIAÇÃO SENSORIAL DO TESTE DE ORDENAÇÃO
PREFERÊNCIA**

**PPGCTA**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV

TESTE ORDENAÇÃO PREFERÊNCIA

Nome: _____

Instruções: Por favor, avalie as amostras codificadas de biscoitos, da esquerda para a direita, e coloque-as em ordem decrescente de preferência:

Código da amostra:

_____ Amostra mais preferida

_____ Amostra menos preferida

Comentários:

APÊNDICE E**FICHA PARA AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS TESTES DE
ACEITABILIDADE E INTENÇÃO DE COMPRA**



PPGCTA

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV

TESTE DE ACEITABILIDADE

Nome: _____

Instruções: Por favor, prove a amostra de biscoito e dê uma nota para cada atributo, seguindo a seguinte escala:

9 – Gostei muitíssimo

8 – Gostei muito

7 – Gostei moderadamente

6 – Gostei ligeiramente

5 – Não gostei/nem desgostei

4 - Desgostei ligeiramente

3 – Desgostei moderadamente

2 – Desgostei muito

1 – Desgostei muitíssimo

Código da amostra _____

Atributos	Nota
Aparência	
Sabor	
Aroma	
Textura	
Nota global para o biscoito	

Escala de intenção de compra

Com que frequência você compraria o biscoito?

1 – Certamente eu não compraria

2 – Provavelmente eu não compraria

3 – Talvez eu compraria / talvez eu não compraria

4 – Provavelmente eu compraria

5 – Certamente eu compraria

Valor atribuído _____

Comentários: _____

APÊNDICE F**QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS SOCIOECONÔMICOS E
DEMOGRÁFICOS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO CLÍNICO**



PPGCTA

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV

O questionário abaixo faz parte de uma pesquisa de mestrado da UPF. Para preencher o questionário, marque um X no parênteses que corresponde a sua resposta. Os dados pessoais não serão divulgados. Muito obrigada pela compreensão e participação na pesquisa!

PESQUISA – COOKIE ENRIQUECIDO COM CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE: EFEITO NA FORMAÇÃO E REABSORÇÃO ÓSSEA

Dados demográficos					
Nome: _____					
Qual seu sexo: (1) Feminino (2) Masculino					
Qual é sua raça/cor: (1) Branca (2) Parda (3) Negra (4) Amarela					
Qual é seu estado civil? (1)Solteiro (2)Casado (3) Divorciado/Separado (4)União estável					
Qual é sua idade? __ anos					
Qual é sua escolaridade?					
(1) Fundamental incompleto (2) Fundamental completo (3) Médio incompleto (4) Médio completo (5) Superior incompleto (6) Superior completo (7) Pós-graduação					
Dados socioeconômicos (ABEP, 2014)					
Marque com um X, a quantidade de cada um dos itens listados abaixo que você possui.					
	Quantidade				
Itens	0	1	2	3	+4
Banheiros					
Empregados domésticos					

Automóveis					
Microcomputador					
Lava louças					
Geladeira					
Freezer					
DVD					
Micro-ondas					
Motocicleta					
Secadora de roupas					

Qual é o grau de instrução do chefe da família?

Escolaridade da pessoa de referência	
Analfabeto / Fundamental I incompleto	
Fundamental I completo / Fundamental II incompleto	
Fundamental II completo / Médio incompleto	
Médio completo / Superior incompleto	
Superior completo	

Você tem acesso aos seguintes serviços públicos?

Água encanada: (1) Sim (2) Não

Rua pavimentada: (1) Sim (2) Não

Dados alimentares

Você consumiu biscoitos ou bolachas no último mês? (1) Sim (2) Não

Com que frequência você consumiu biscoitos ou bolachas no último mês?

(1) uma vez no mês (2) uma vez por semana

(3) de duas a três vezes por semana (4) todos os dias

Marque qual(is) o(s) tipo(s) de biscoito ou bolacha você consome?

Integral (1)

Doce (2)

Salgado (3)

Com aveia (4)

ANEXOS

ANEXO A

**PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
COM SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: BISCOITO TIPO COOKIE ENRIQUECIDO COM CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE E SEU EFEITO NA FORMAÇÃO E REABSORÇÃO ÓSSEA DE INTOLERANTES À LACTOSE

Pesquisador: GRAZIELA DE CARLI

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43742015.8.0000.5342

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.088.511

Data da Relatoria: 05/06/2015

Apresentação do Projeto:

O desenvolvimento de novos produtos alimentícios torna-se cada vez mais desafiador, à medida que procura atender à demanda dos consumidores por produtos que, concomitantemente, sejam saudáveis e atrativos. Biscoitos são produtos que apresentam grande interesse comercial e estão em constante desenvolvimento. Os concentrados proteicos de soro de leite têm uma vasta aplicação na indústria alimentícia pela versatilidade funcional tecnológica sob a forma de ingredientes em alimentos e pelas propriedades nutricionais, por possuírem componentes ativos que auxiliam na manutenção da saúde óssea. O osso é um tecido bastante dinâmico que constantemente está formando tecido novo por meio dos osteoblastos e ressovendo através dos osteoclastos, processo conhecido como turnover (ciclo). A osteoporose, distúrbio osteometabólico, é caracterizado por redução da massa óssea e alteração de sua microarquitetura. A alimentação é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento e manutenção da massa óssea e na prevenção e tratamento da osteoporose. Os indivíduos intolerantes à lactose geralmente evitam produtos à base de leite, sendo que esta baixa ingestão de cálcio ao longo da vida é fator de risco para osteoporose

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver um biscoito tipo cookie enriquecido com concentrado proteico do soro do leite e

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo

Bairro: Divisão de Pesquisa / São José **CEP:** 99.052-900

UF: RS **Município:** PASSO FUNDO

Telefone: (54)3316-8157

E-mail: cep@upf.br

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-



Continuação do Parecer: 1.088.511

aveia e avaliar seu efeito na formação e reabsorção óssea em pessoas intolerantes à lactose.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá riscos no desenvolvimento desta pesquisa aos participantes.

Benefícios:

Contribuir com estudos na área de alimentação.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão produzidos biscoitos tipo cookie enriquecidos com diferentes proporções de concentrado proteico do soro do leite e aveia. As características físicas, químicas, microbiológicas e as propriedades nutricionais dos biscoitos serão avaliadas. A aceitabilidade e a intenção de consumo dos biscoitos produzidos serão avaliadas através de análise sensorial. Será realizado um estudo in vivo com 15 pacientes intolerantes à lactose objetivando avaliar a formação e reabsorção óssea, estado nutricional, composição corporal e ingestão alimentar.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os direitos fundamentais do(s) participante(s) foi(ram) garantido(s) no projeto e no TCLE. O protocolo foi instruído e apresentado de maneira completa e adequada. Os compromissos do (a) pesquisador (a) e das instituições envolvidas estavam presentes.

Recomendações:

Após o término da pesquisa, o CEP UPF solicita:

- a) A devolução dos resultados do estudo ao(s) sujeito(s) da pesquisa ou a instituição que forneceu os dados;
- b) Enviar o relatório final da pesquisa, pela plataforma, utilizando a opção, no final da página, "Enviar Notificação" + relatório final.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, este Comitê, de acordo com as atribuições definidas na Resolução n. 466/12, do Conselho Nacional da Saúde, Ministério da Saúde, Brasil, manifesta-se pela aprovação do

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo

Bairro: Divisão de Pesquisa / São José **CEP:** 99.052-900

UF: RS **Município:** PASSO FUNDO

Telefone: (54)3316-8157

E-mail: cep@upf.br

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-



Continuação do Parecer: 1.088.511

projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PASSO FUNDO, 01 de Junho de 2015

Assinado por:
Nadir Antonio Pichler
(Coordenador)

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo

Bairro: Divisão de Pesquisa / São José **CEP:** 99.052-900

UF: RS **Município:** PASSO FUNDO

Telefone: (54)3316-8157

E-mail: cep@upf.br