

Leite Humano com Baixo Teor de Lactose:

uma alternativa no tratamento da intolerância secundária à lactose em crianças

Silvania Moraes Bottaro¹
Cleide Rosana Vieira Batista²

Resumo

A pesquisa teve como objetivo reduzir a lactose do leite humano para que possa ser usado no tratamento dietético de lactentes com intolerância secundária à lactose, evitando a introdução precoce de outro alimento que não seja o leite materno. O processo de hidrólise foi desenvolvido através de uma enzima comercial, obtendo-se a média de 75,35% de hidrólise em cinco experimentos. O valor protéico não apresentou variação nos resultados, antes e após a hidrólise, sendo a média das amostras hidrolisadas e não hidrolisadas igual a 1,2g/100 mL. Nas amostras hidrolisadas o teor médio de lipídios foi de 3,8 g/100 mL, e o teor médio encontrado nas amostras após a hidrólise do leite humano foi de 3,3 g/100 mL. O leite humano hidrolisado comparado com o não hidrolisado apresentou teores equivalentes de sólidos totais, cinzas, acidez total, acidez em ácido láctico, cálcio e

¹ Professora do Curso de Nutrição da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. Mestre em Ciências dos alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina.

² Professora Doutora do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

fósforo. As condições higiênico-sanitárias do leite humano mostraram ausência de *Salmonella sp e Listeria monocytogenes* tanto nas amostras do leite humano não hidrolisadas como nas hidrolisadas. Todas as amostras apresentaram o mesmo índice de coliformes fecais e *Staphylococcus aureus* antes e após a hidrólise.

Palavras-chave: lactose, lactase, intolerância à lactose, leite humano.

Human Milk with Low Lactose Tenor: an alternative to the treatment of the secondary lactose intolerance in children

Abstract: The research had it as a goal to reduce the lactose of human milk so that it can be used for dietetic treatment of lactant with secondary intolerance to lactase with avoids the premature introduction of other food. The hydrolysis process was developed through a commercial lactase enzyme by which it was obtained an average of five experiments, 75,35% of hydrolysis of human milk. The protein value didn't present variation in the results, neither before nor after the hydrolysis, being that the average of hydrolysed samples and non-hydrolysed sample to be the same to 1,2/100 mL. In the hydrolysed samples, the mid-substance of lipids was or 3,8g/mL, and the mid-substance found in the samples after the human milk was hydrolysed was 3,3g/100 mL. The hydrolysed human milk compare to the non-hydrolysed milk reflected equivalent substance of total solids, ashes, total acidity in lactose acid, calcium and phosphorus. The hygienic-sanitary conditions of the human milk showed the absence of *Salmonella sp e Listeria monocytogenes* both in the samples of non-hydrolysed human milk and the hydrolysed human milk. All the samples presented the same frequency of bowel movements and *e Staphylococcus aureus* before and after the hydrolysis.

Keywords: lactose, lactase, lactose intolerance, human milk.

Introdução

Visando manter o leite humano na alimentação de lactentes com intolerância secundária à lactose, reduzimos o teor da lactose do leite humano através de hidrólise enzimática. Esse processo foi desenvolvido utilizando-se uma b-galactosidase produzida a partir da fermentação submersa de uma cepa selecionada da levedura *Kluyveromyces fragilis*. A mesma encontra-se disponível comercialmente como Lactozym, tipo HP. Conforme Zadow (1986) e Penet (1991) enzimas comerciais hidrolizantes têm importante vantagem na redução da lactose contida no leite ou produtos derivados do leite, sem afetar a proteína.

A intolerância à lactose é estimada em 70% da população mundial e as causas advêm da ausência ou redução da atividade da enzima lactase (Holsinger; Kligerman, 1991). A enzima lactase, também denominada b-galactosidase, é sintetizada, no organismo humano, no retículo endoplasmático rugoso como molécula precursora, disposta em cadeia simples, com alto conteúdo de manose. Depois de ser transportada ao aparelho de Golgi, estas moléculas precursoras são glicosadas e transportadas para as microvilosidades intestinais (Stiehm, 1991). Desta forma, nas vilosidades intestinais, torna-se responsável pela degradação da lactose em seus monossacarídeos, glicose e galactose (Holsinger; Kligerman, 1991; Gudman, 1994).

A maioria das crianças aceita bem o leite, mas existem algumas que apresentam problemas relacionados à absorção de lactose. As crianças que apresentam sintomas de má absorção logo ao nascer, têm ausência da enzima lactase. Esta intolerância é hereditária e rara, sendo considerada um erro inato do metabolismo, devido ao gene homozigótico recessivo autossômico (Bilir, 1972; Sevá-Pereira et al., 1982; Ceriane et al., 1988; Brummer et al., 1993). A intolerância primária tem como causa básica a diminuição residual da enzima lactase. Esta redução faz a analogia com a idade da pessoa e pode manifestar-se após os dois e até os cinco anos de idade, quando a enzima perde seu potencial, após o desmame e início da infância. A intolerância secundária é o

tipo mais comum e a deficiência resulta de algum dano na mucosa do intestino delgado, causada, entre outros motivos, pelas gastrinterites agudas, desnutrição, doença celíaca, sprue tropical, fibrose cística, em portadores do vírus HIV, infestação por *Giardia lamblia*, gastrectomia e tratamento com certos medicamentos (Yolken et al., 1990; Miller et al., 1991; Shils et al., 1994).

O leite humano possui elevado teor de lactose, em média 7,1 g/100 mL, podendo tornar-se inconveniente na dieta de crianças com a má absorção desse dissacarídeo (Gudman, 1994). Nessas situações é imprescindível dispor de outro alimento que possa substituir o leite humano, mesmo que este seja o alimento ideal para ser oferecido até os seis meses de idade. Nesse sentido, o leite humano modificado pode ser utilizado no atendimento dos lactentes nos quais se justifique clinicamente.

Conforme Holsinger & Kligerman (1991), lactases comerciais utilizadas na forma de comprimidos, gotas e/ou tabletes que contêm a enzima lactase derivada da levedura *Kluyveromyces lactis* e/ou do fungo *Aspergillus oryzae* reduzem a lactase em 70%. A vantagem deste tipo de produtos é que podem ser usados antes da pessoa ingerir uma refeição que contenha o leite e por consequência lactose. Em estudos recentes foi demonstrado que usando de 375 a 500 mg de Lactrase, uma lactase disponível e comercializada na forma de tablete, diminuem os sintomas clínicos da intolerância à lactose (Moskovitz et al., 1987; Holsinger & Kligerman, 1991).

O processo descrito a seguir permite que o leite humano seja hidrolisado em bancos de leite humano, com baixo custo e seja oferecido para crianças com intolerância secundária, pois estas não deixam de produzir a enzima lactase, mas sim apresentam uma ineficiência enzimática temporária, portanto o intestino tem capacidade de hidrolisar parte desta lactose e, tão logo a lesão da mucosa intestinal for sanada e a atividade enzimática voltar ao normal, o leite humano pode ser oferecido normalmente (Shils et al., 1994).

Material e Métodos

Os trabalhos experimentais descritos foram desenvolvidos nos laboratórios de Bromatologia e de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC; Florianópolis, SC) do Departamento de Ciências e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias e no Laboratório de Análises da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (Unijuí), localizado no município de Santa Rosa.

O leite humano utilizado na pesquisa pertencia ao “pool” de leite humano maduro, de mulheres em estágio de lactação livre do colostro. O leite foi coletado no banco de leite do Hospital Infantil Joana de Gusmão (Florianópolis, SC) e no Hospital de Caridade de Ijuí (RS), acondicionado em mamadeira de polietileno, pasteurizado (62,5°C) e congelado (-18°C) no banco de leite dos hospitais. A enzima usada na pesquisa foi a Lactozym-HP (lactase), com atividade enzimática de 3000 LAU/mL, sendo um produto ultrapurificado e por isso recomendado para o tratamento do leite. Além de que, cepas selecionadas da levedura *Kluyveromyces fragilis* são mais utilizadas em produtos lácteos devido à produção de uma lactase intracelular, com pH estável próximo ao leite, diminuindo a possibilidade de interferência no teor de outro nutriente do leite (Zadow, 1986; Penet, 1991).

Estudos preliminares foram realizados através de gradientes de concentrações enzimáticas, com a finalidade de otimizar a enzima lactase em relação ao tempo e concentração enzimática, segundo as especificações padrões da enzima. Para cada gradiente de concentração utilizou-se uma amostra de 600 mL de leite humano, fracionados em seis unidades amostrais de 100 mL, cujo pH foi ajustado para 6,5. Nas seis unidades foram utilizadas cinco concentrações enzimáticas diferentes (150 µl/100 mL; 350 µl/100 µL; 500 µl/100 mL; 750 µl/100 mL; 850 µl/100 mL e uma sexta amostra de 100 µl/100 mL foi tomada como controle). As amostras ficaram por cinco horas em temperatura constante de 37°C. A determinação da glicose e galactose foi realizada

pelo método de Nickerson; (Nickerson; Vujicic; Lin, 1975). Paralelamente a cada experimento determinou-se, em tempo zero, a concentração de lactose na amostra de leite humano não hidrolisada (tomada como controle) através do método de Teles (Teles; Young; Stull, 1978). A escolha dos métodos utilizados teve como princípio a praticidade de realizá-los em ambientes que não fosse o laboratório, como em Banco de Leite e residências, bem como o custo para realizar a hidrólise.

A partir das condições do processo de hidrólise, definidas anteriormente através dos gradientes de concentração enzimática, estabeleceu-se a concentração da enzima lactase em 750 μ L/100mL de leite humano (2250 LAU), em 4 horas de incubação a 37°C constante. O plano atribuído para os experimentos foi de cinco amostras diferentes de leite humano. Cada amostra foi dividida em 3 unidades amostrais de 300 mL, das quais, 100 mL foi utilizado como amostra controle do leite humano não hidrolisado, sendo que esta amostra não fez parte do processo de hidrólise e não sofreu a ação da temperatura por 4 horas. O objetivo desta amostra era determinar a concentração de lactose do leite humano, segundo o método de Teles, bem como, servir de parâmetro no controle microbiológico e nas análises físico-químicas (Teles; Young; Stull; 1978). Outros 100 mL foram submetidos ao processo de hidrólise sem adição de enzima, tomada como controle da hidrólise e 100 mL restantes destinaram-se para hidrólise, portanto nesta amostra foi adicionada a enzima. As amostras foram agrupadas segundo o destino da análise e separadas pelo número de amostras, designadas de A, B, C, D e E, para efeito de análise. A extensão da hidrólise foi analisada pelo método Nickerson (Nickerson; Vujicic; Lin, 1975) através da determinação da glicose e galactose. As amostras controle do leite humano não hidrolisado e as amostras de leite humano hidrolisado (com adição e sem adição de enzima) também foram submetidas às análises físico-químicas e microbiológicas no intuito de se avaliar possíveis variações dos componentes nutricionais do leite humano, antes e após a hidrólise, bem como foram avaliadas quanto às condições higiênico-sanitárias, referentes às quais o processo foi submetido.

As análises físico-químicas foram realizadas segundo a metodologia da AOAC – Association of Official Analytical Chemists – Official Methods of Analysis – (1984), sendo determinado: proteína, lipídios, sólidos totais, acidez total, acidez em ácido láctico, cinzas, cálcio e fósforo.

Para as análises microbiológicas seguiu-se a metodologia do APHA – American Public Health Association (1992) e FDA – Food and Drug Administration (1995) para contagem padrão de psicotróficos (21° – 48 horas), contagem de coliformes totais, contagem de coliformes de origem fecal, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes*.

Resultados e Discussão

Os resultados foram avaliados estatisticamente através da análise de variância de uma via, pelo teste de comparação múltiplas médias de Duncan e pela análise de regressão, utilizando-se o programa software científico/Soc/Embrapa. Considerou-se diferenças entre médias estatisticamente significativas quando o nível de probabilidade (p) foi menor do que 0,05 ($< 0,05$).

O resultado médio obtido na otimização da atividade enzimática em diferentes gradientes de concentração enzimática foi de 70,56% de hidrólise do leite humano na quarta hora, em concentração enzimática de 750 $\mu\text{l}/100\text{ mL}$, pH 6,5 e 37°C. Este resultado aponta que a enzima poderia apresentar melhor performance, pois após cinco horas obteve-se 75,67% de hidrólise. Os resultados da média de hidrólise obtida dos dois gradientes de concentração, tomados como referência, estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 – Média do grau de hidrólise obtida de gradientes de concentrações enzimáticas diferentes, em pH 6,5, temperatura constante de 37°C, no período de 5 horas.

Amostras de leite humano	Concentração enzimática (μ /100 mL)	Média do teor de lactose	Grau de Hidrólise x Tempo (%)				
			1	2	3	4	5
Controle		7,5					
1	150		20.48	20.68	25.46	36.08	43.39
2	350		21.18	31.61	39.75	44.61	56.68
3	500		32.12	41.48	43.70	60.03	69.37
4	750		42.48	44.82	49.95	70.56	75.67
5	850		52.30	54.81	58.04	75.96	74.97

Após cinco horas de hidrólise o comportamento da enzima foi semelhante ao obtido na quarta hora de hidrólise e notou-se uma oscilação nos resultados, apesar de continuar apresentando resultados de hidrólise praticamente com o mesmo efeito da quarta hora, a qual tem a vantagem de estar em concentração enzimática inferior. Dados semelhantes foram obtidos por Prakash e Sharma (1984) e Silva et al. (1984), em estudos da hidrólise do leite de búfalo e do leite de vaca respectivamente.

Portanto, os ensaios enzimáticos permitiram a padronização da concentração da enzima no tempo de quatro horas na concentração de 750 μ L/100mL de leite humano (2250 LAU), pH 6,5 e temperatura constante de 37°C.

Este resultado foi utilizado para a realização da hidrólise enzimática para cinco amostras de leite humano nas mesmas condições. A correlação média de hidrólise enzimática para as cinco amostras do leite humano alcançou 75,35%, como mostra a tabela 2.

Tabela 2 – Correlação do teor de lactose com o grau de hidrólise das cinco amostras de leite humano, pós 4 horas, à temperatura constante de 37°C, concentração da enzima de 750 µl/100 mL, Ph 6,5.

Amostras de leite Humano	Média do teor de lactose (g/100 mL)	Média do Grau de hidrólise nas cinco amostras de leite humano hidrolisado (%)
A	7.3	79.16
B	7.7	70.28
C	7.6	76.68
D	7.5	71.06
E	7.4	79.60
Média	7.5	75.35

Ao determinar os componentes nutricionais do leite humano observou-se que o teor médio de proteína, das cinco amostras de leite humano, foi de 1,2 g/100 mL antes e após a hidrólise do leite humano. Quando aplicado o Teste Duncan para a análise da proteína observou-se diferença significativa em nível de 5% ($p < 0.05$) na amostra denominada de "D"; esta significância foi observada quando comparadas às amostras de antes e após a hidrólise. As outras quatro amostras (A, B, C e E) não apresentaram diferença estatisticamente significativa, antes e após a hidrólise, conferindo maior homogeneidade. Com a finalidade de saber o grau de relacionamento entre a proteína e as outras variáveis analisadas, como grau de hidrólise, pH, tempo e temperatura, aplicou-se a análise de correlação de Pearson. Através desta análise observou-se uma correlação negativa entre o teor de proteínas e de cinzas após a hidrólise, nas amostras de leite humano sem adição de enzima (controle da hidrólise). A correlação sendo negativa indica que à medida que a proteína está disponível, o teor de cinzas decresce. Corroborando com este resultado, as mesmas amostras de leite humano sem adição de enzima, no processo de hidrólise, apresentaram correlação negativa entre a proteína e o fósforo. Ao aplicarmos a análise de regressão, a proteína apresentou uma relação com o grau de hidrólise do leite humano em todas as amostras hidrolisadas, à medida que aumentou o grau de hidrólise, a proteína alcançou a média de 1,2 g/100 mL, para todos os experimentos.

Comparando as amostras de leite humano anteriores a hidrólise com as amostras de leite humano após a hidrólise (com adição de enzima e sem adição de enzima), verificou-se que as amostras do leite humano após a hidrólise sofreram redução no teor de lipídios durante o processo de hidrólise, visto que, o teor médio de lipídios, para as cinco amostras de leite humano não hidrolisadas, foi de 3,8 g/100mL, os quais diferem do teor médio obtido após a hidrólise do leite humano de 3,3 g/100mL. Todas as amostras de leite humano apresentaram para o teor de lipídios diferença significativa entre si, ao nível de 5% ($p < 0.05$). Sugere-se que essa redução possa estar relacionada com o tratamento térmico (temperatura constante de 37°C) e o processo de hidrólise.

Os sólidos totais, cinzas, acidez total, acidez em ácido láctico, cálcio e fósforo foram analisados nas cinco amostras. Os teores médios encontrados revelam valores equivalentes, comparando as amostras de leite humano antes e após a hidrólise.

As análises microbiológicas realizadas nas cinco amostras de leite humano apresentaram os resultados médios da contagem e/ou presença de microorganismos, antes e após hidrólise, demonstrados na tabela 3.

Tabela 3 – Média de cinco experimentos da contagem e/ou presença de microrganismos para cinco amostras de leite humano, antes e após a hidrólise enzimática.

Amostras de leite humano	Contagem Psicrotróficos (UFC/mL)	Coliformes totais (NMP/mL)	Coliformes fecais (NMP/mL)	<i>Salmonella sp</i> (25 mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL)	<i>Listeria monocitogenes</i> (25 mL)
Leite humano não hidrolisado (controle)	2,3 x 10 ^a	0,3 a	< 0,3	Ausência	< 10 ²	Ausência
Leite humano hidrolisado com adição de enzima	1,4 x 10 ^{2 b}	1,5 x 10 ^b	< 0,3	Ausência	< 10 ²	Ausência
Leite humano hidrolisado sem adição de enzima (controle)	7,1 x 10 ^{3 b}	1,2 x 10 ^{2 b}	< 0,3	Ausência	< 10 ²	Ausência

Os resultados destes estudos mostraram ausência de *Salmonella* sp e *Listeria monocitogenes* tanto na amostra de leite humano não hidrolisada como nas amostras submetidas ao processo de hidrólise. Todas as amostras apresentaram o mesmo índice de coliformes fecais e *Staphylococcus aureus*, ou seja, 0,3 NMP/mL e 10^2 UFC/mL, respectivamente.

A contagem padrão de psicrotróficos ($21^{\circ}\text{C} - 48\text{h}$) e a contagem de coliformes totais apresentaram diferença significativa em um nível de 5% ($p < 0.05$) em relação a duas amostras hidrolisadas (A e D), uma vez que as mesmas apresentaram maior variação à medida que transcorre o processo de hidrólise. Os valores acima do limite para as bactérias psicrotróficas podem ser explicados pelas diferentes temperaturas sofridas pelo leite humano, às quais são capazes de formar colônias independente de sua temperatura ótima de crescimento (Jay, 1994). Sugere-se ainda que a variação tenha ocorrido devido ao processo de hidrólise, pois o leite humano foi mantido em 37°C por 4 horas, o que pode ter contribuído no aumento do número de microrganismos. Outra explicação para o número elevado de bactérias psicrotróficas pode ser a maior disponibilidade de glicose resultante do processo de hidrólise. Os resultados das análises foram comparados aos valores permitidos pela Portaria 451-DINAL/MS/1987, ao produto leite pasteurizado tipo C, o qual pode apresentar como limite máximo de contagem total de microrganismos de 3×10^5 UFC/mL; a contagem de coliformes totais tem como limite 1×10 NMP/mL e para os coliformes de origem fecal 2 NMP/mL.

Conclusões

O processo de hidrólise atendeu às condições da concentração enzimática de $750 \mu\text{L}/100\text{mL}$, no tempo de 4 horas, pH 6,5 e temperatura de 37°C determinadas por gradiente de concentração da enzima lactose. Nessas condições, foi possível obter de 70 a 75% de hidrólise do leite humano.

O leite humano com baixo teor de lactose pode ser uma alternativa no tratamento dietético de lactentes e crianças com intolerância secundária à lactose, pois a partir da hidrólise há redução média de 75% da lactose. Através das análises físico-químicas, da proteína e dos lipídios do leite humano hidrolisado foi possível determinar que o leite humano hidrolisado não sofreu variação significativa em seus teores. Os resultados das análises microbiológicas mostraram que o leite humano com baixo teor de lactose é aceitável para o consumo.

Bibliografia

AMERICAN public health association (APHA). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3.ed. Washington, 1992.

ASSOCIATION of official analytical chemists. AOAC. *Official methods of analysis*. 12.ed. Washington, 1984.

BILIR, S. Acquired disaccharide intolerance in children with malnutrition. *J Clin Nutr (USA)* 1972; 25: 664-71.

BRASIL, Comitê Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução n. 20/76. *Diário Oficial da União*, Brasília, 25 out. 1976. Seção 1, pt.1.

BRASIL. Portaria n.1, de 28 de janeiro de 1987. DINAL-MS. Aprova padrões microbiológicos para produtos destinados ao consumidor. *Diário Oficial da União*, Brasília, nº 29, 12 de fev. 1987. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição – INAN. *Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno*. Normas gerais para bancos de leite humano. 1.ed. Brasília. 1995.

BRUMMER, R. J. M.; KARIBE, M.; STOCKBRÜGGER, R. W. *Lactose malabsorption: optimalization of investigational methods*. *J Gastr. (Barcelona)* 1993; 28(200): 65-9.

CERIANE, N.; ZUCCATO, E.; FONTANA, M.; ZUIN, G.; FERRARI, L.; PRICIPI, S.; PACCAGNINI, S.; MUSSINI, E. Lactose malabsorption and recurrent abdominal pain in italian children. *J Pediatr Gastr Nutr (New York)* 1988; 7 (6): 852-7.

DURAN G. A. O.; ANGELIS, R. C. Intolerância ou tolerância a produtos lácteos. *Rev. do ILCT* 1985; 40 (241): 17-30.

ERINOSO, H. O.; HOARE, S.; SPENCER, S.; LUNN, P. G.; WEAVER, L. T. Is cow's milk suitable for the dietary supplementation of rural Gambian children? Prevalence of lactose maldigestion. Cambridge. *Ann Trop Paediatr* 1992; 12 (4): 359-65.

GUDMAN, H. The clinical significance of disaccharide maldigestion. *Am J Clin Nutr* (New York) 1994; 59 (3 supl): 735-41.

GUPTA, R.; GUPTA, S. Dietary management of lactose intolerance-lactase treated milk versus soya milk. *J Med Sci* (India) 1993; 47 (1): 1-7.

HOLSINGER, V. H.; KLIGERMAN, A. E. Applications of lactase in dairy foods and others foods containing lactose. *Food Technol* (Chicago) 1991; 45: 92-5.

JAY, J. M. *Modern food microbiology*. 3.ed. New York: Van Nostrand Reinhold. 1994.

MILLER, T. L.; ORAV, J. E.; MARTIN, S. R.; COOPER, E. R.; MCINTOSH, K.; WINTER, H. S. Malnutrition and carbohydrate malabsorption. In: *Children with vertically transmitted human immunodeficiency virus infection*. Gastroenterology (New York) 1991; 100: 1296-1302.

MOSKOVITZ, M.; CURTI, C.; GAVALER, J. Does oral enzyme therapy reserve intestinal lactose malabsorption? *Am J Gastroentrol* (New York) 1987; 82: 632-5.

NICKERSON, T. A.; VUJICIC, I. F.; LIN, A. Y. Colorimetric estimation of lactose and its hydrolytic products. *J Dairy Sci* (Champaign) 1975; 59 (3): 386-90.

PENET, C. S. New application of industrial food enzymology: economics and processes. *Food Technol* 1991; 13: 98-9.

PRAKASH, S.; SHARMA, R. S. Composition and storage characteristics of *Khoa* made from lactose hydrolysed buffalo milk. *J Food Sci Technol* (India) 1984; 21: 78-80.

RIEL, R. *Composición y estructura físico-química de la leche*. Espanha: Ed. Acríbia, 1991.

SCRIMSHAW, N. S.; MURRIA, E. Tolerancia a la lactosa y el consumo de leche: mitos y realidades. *Arch Lat Am Nutr* 1988; 38 (3): 543-47.

SEVÁ-PEREIRA, A.; BEIGUELMAN, B. Malabsorção primária de lactose em brasileiros adultos caucasóides, negróides e mongolóides sadios. *Arq Gastroent*. São Paulo 1982; 19 (3): 133-38.

SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M. *Modern nutrition in health and disease*. 8.ed. EUA: Copyright, 1994.

SILVA, T. B. P.; PINHEIRO, A. J. R.; COELHO, D. T.; PEREIRA, A. S.; CHAVES, J. B. P. Utilization of Beta-D-galactosidase on the continuous processing of homogenized "doce de leite". *Rev do ILCT* 1984; 39 (232): 19-30.

STIEHM, E. R. Transmission of human immunodeficiency virus infection by breast-feeding. *J Pediatr* (Los Angeles) 1991; 22 (9): 410-12.

TELES, F. F.; YOUNG, C. K.; STULL, J. W. A method for rapid determination of lactose. *J Dairy Sci* 1978; 61 (4): 506-8.

YOLKEN, R. H.; HART, W.; OUNG, I.; SHIFF, C., GREENSON, J., PERMAN, J. A. Gastrointestinal dysfunction and disaccharide intolerance in children infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr* (Baltimore) 1990; 118 (3): 359-63.

YOUNES, H.; LEVRAT, M.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Relationship between fermentations and calcium in the cecum of rats fed digestible or resistant starch. *Ann Nutr Metab* (France) 1993; 37: 311-19.

ZADOW, J. G. Lactose hydrolysed dairy products. *Food Technol* (Australia) 1986; 38 (11): 460-1.

_____. Lactose: properties and uses. *J Dairy Sci* (Champaign) 1983; 67: 2654-679.