

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 28/03/2025.

Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Efeitos da radiação UV-C e hidrólise na
estrutura e digestibilidade das proteínas do soro
de leite bovino**

Cecília de Souza Cordeiro

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos alimentos

Orientadora: Profa. Dra Renata Tieko Nassu

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

Araraquara

2023

Efeitos da radiação UV-C e hidrólise na estrutura e digestibilidade das proteínas do soro de leite bovino

Cecília de Souza Cordeiro

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos alimentos

Orientadora: Profa. Dra Renata Tieko Nassu

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

Araraquara

2023

C794e Cordeiro, Cecília de Souza.
Efeitos da radiação UV-C e hidrólise na estrutura e digestibilidade das proteínas do soro de leite bovino / Cecília de Souza Cordeiro. – Araraquara: [S.n.], 2023.
89 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos. Área de Concentração em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Renata Tieko Nassu.
Coorientador: Daniel Rodrigues Cardoso.

1. UV-C. 2. Peptídeos bioativos. 3. Hidrólise. I. Nassu, Renata Tieko, orient. II. Cardoso, Daniel Rodrigues, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030055P6
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Efeitos da radiação UV-C e hidrólise na estrutura e digestibilidade das proteínas do soro de leite bovino

AUTORA: CECÍLIA DE SOUZA CORDEIRO

ORIENTADORA: RENATA TIEKO NASSU

COORIENTADOR: DANIEL RODRIGUES CARDOSO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Alimentos e Nutrição, área: Ciência dos Alimentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. RENATA TIEKO NASSU (Participação Virtual)
Embrapa Pecuária Sudeste / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) - São Carlos

Dra. ANA RITA DE ARAUJO NOGUEIRA (Participação Virtual)
Embrapa Pecuária Sudeste / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) - São Carlos

Profa. Dra. JULIANA CRISTINA BASSAN (Participação Virtual)
Universidade Paulista (UNIP)

Dra. SINARA TEIXEIRA DO BRASIL MORAIS (Participação Virtual)
Instituto de Física de São Carlos / Universidade de São Paulo (USP)

Araraquara, 28 de setembro de 2023

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio no projeto (FAPESP N. 2017/01189-0).

Agradeço à minha orientadora Renata Tieko Nassu e coorientador Daniel Rodrigues Cardoso.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, ao Instituto de Química USP- São Carlos e a Embrapa Pecuária Sudeste pela infraestrutura e aporte. Assim como aos professores, técnicos e colegas de pós-graduação que de alguma forma ajudaram e me apoiaram no desenvolvimento desse projeto.

Agradeço também aos meus pais, ao meu marido Diego e minhas filhas Lis e Íris que vieram durante este percurso.

RESUMO

Estudos sugerem que muitas das proteínas de soro de leite bovino possuem propriedades fisiológicas, desde atividade anticancerígena até influência na função digestiva. Estas funções estão diretamente ligadas à disponibilidade de peptídeos bioativos provenientes das proteínas. Para obtenção e aumento da disponibilidade destes peptídeos, uma das maneiras seria a partir da hidrólise de proteínas, combinado com a aplicação de processos não térmicos como radiação ultravioleta (UV-C), onde é possível modificar as estruturas das proteínas, gerando produtos lácteos com melhor perfil nutricional e propriedades funcionais. Dessa forma, com o emprego da do processamento não térmico junto da hidrólise enzimática seria possível aumentar a biodisponibilidade das proteínas do soro de leite, resultando em um ingrediente com perfil de peptídeos adequado, tendo como foco a saúde do público idoso. O envelhecimento populacional vem crescendo a cada dia, sendo que a população idosa é altamente susceptível ao desequilíbrio nutricional. A ingestão adequada de proteínas desempenha um papel crucial na saúde e no bem-estar dos idosos, especialmente quando se trata de prevenir ou retardar condições como a sarcopenia. Devido a este fato, a busca por nutrientes em fontes alimentares ricos em proteínas para suprir essa necessidade tem sido importante. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação de processamento não térmico (UV-C) combinado com hidrólise enzimática na estrutura proteica de soro de leite bovino. O estudo compreendeu um estudo do perfil do consumidor do público-alvo; caracterização da matéria prima inicial (soro de leite) por meio de análises de composição química; comparação da qualidade microbiológica de soro de leite submetido aos processamentos UV-C e térmico tradicional (pasteurização); caracterização dos peptídeos obtidos no processamento de soro de leite submetido à radiação UV-C e hidrólise, por meio de espectrometria de massas de ionização/dessorção de matriz assistida por laser/tempo de "voo" (MALDI-TOF). Nas condições estudadas, o tratamento UV-C no soro de leite foi eficiente microbiologicamente e após hidrólise enzimática houve um aumento da concentração do peptídeo bioativo ALPHMIR que é conhecido por exercer um efeito anti-hipertensivo. Dessa forma, o produto obtido tem potencial para ser um ingrediente de produtos lácteos com peptídeo bioativo, porém ainda é necessário estudos de análise sensorial para definir como este ingrediente deve ser utilizado.

Palavras-chave: UV-C; peptídeos bioativos; hidrólise.

ABSTRACT

Studies suggest that many of the whey proteins in bovine milk have physiological properties, from anticancer activity to digestive function. These functions are directly linked to the availability of bioactive peptides from proteins. To obtain and increase the availability of these peptides, one of the ways would be from the hydrolysis of proteins, combined with the application of non-thermal processes such as ultraviolet radiation (UV-C), where it is possible to modify the structures of the proteins, generating dairy products with better nutritional profile and healthy properties. Thus, with the use of non-thermal processing along with enzymatic hydrolysis, it would be possible to increase the bioavailability of whey proteins, evolving into an ingredient with an adequate peptide profile, focusing on the health of the elderly public. Seniors are very susceptible to nutritional imbalance and with aging populations the search for nutrients in alternative food sources is growing to meet this need. Adequate protein intake plays a crucial role in the health and well-being of older adults, especially when it comes to preventing or delaying conditions like sarcopenia. Due to this fact, the search for nutrients in protein-rich food sources to meet this need has been important. The aim of this study was to evaluate the effect of applying non-thermal processing (UV-C) combined with enzymatic hydrolysis on the protein structure of bovine whey. The study encompasses a consumer profile survey to the target audience; characterization of the initial raw material (whey) through chemical composition analysis; comparison of the microbiological quality of whey submitted to UV-C and traditional thermal processes (pasteurization); characterization of peptides obtained from the processing of whey submitted to UV-C radiation and hydrolysis, by means of laser-assisted matrix ionization/desorption mass spectrometry/time of flight (MALDI-TOF). Under the conditions studied, the UV-C treatment on whey was microbiologically efficient and after enzymatic hydrolysis there was an increase in the concentration of the bioactive peptide ALPHMIR which is known for antihypertensive effect. In conclusion, the final product has the potential to be an ingredient in dairy products with bioactive peptide, but sensory analysis studies are still needed to define how this ingredient should be used.

Key words: UV-C; bioactive peptides; hydrolysis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ECA	Enzima de conversão da angiotensina-I
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cys	Cisteína
HCCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic Acid
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente
MALDI-TOF/TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry
NAC	N-acetyl-l-cysteine
OPA	o-phthaldialdehyde
P_{app}	Permeabilidade Aparente
Trp	Triptofano
UV	Luz ultravioleta
UV-C	Luz na região do ultravioleta de 200-280 nm
UV-vis	Luz ultravioleta visível
α-La	α -lactalbumina
β-Lg	β -lactoglobulina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das proteínas do leite bovino	17
Tabela 2. Proteínas do soro de leite bovino e seus benefícios	20
Tabela 3. Frequência (%) dos fatores socioeconômicos dos entrevistados e dos consumidores de <i>whey protein</i>	43
Tabela 4. Dados (n = 286) da Escala de Neofobia em relação à Tecnologia de alimentos: descrições de fatores e categorias, média das notas de cada pergunta em uma escala de 5 pontos e desvio padrão.....	50
Tabela 5. Caracterização soro de leite liofilizado	51
Tabela 6. Contagem microrganismos no soro de leite com diferentes tratamentos	56
Tabela 7. Concentração total de analitos (mg kg ⁻¹) e teor bioacessível (%) da amostra de soro de leite liofilizado	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura terciária da (a) β -lactoglobulina e (b) α -lactalbumina.....	19
Figura 2. Espectro de luz	27
Figura 3. Esquema processamento UV-C no soro de leite liofilizado e reconstituído.....	35
Figura 4. Reação do DTNB com tióis livres acessíveis ao solvente em proteínas e formação do TNB ⁻²	36
Figura 5. Frequência dos fatores de importância na compra de produtos alimentícios	44
Figura 6. Frequência dos fatores relacionados a tecnologia aplicada em alimentos, utilizando escala Likert.....	45
Figura 7. Porcentagem de entrevistados que pagariam mais por produtos com tecnologia aplicada e suas rendas	46
Figura 8. Distribuição da frequência de consumo de produtos lácteos	47
Figura 9. Frequência dos motivos relacionados ao consumo de produtos lácteos, utilizando escala Likert.....	48
Figura 10. Frequência motivos relacionado ao consumo de whey protein, utilizando escala Likert.....	49
Figura 11. Cromatograma de amostra de proteína de soro de leite liofilizado da produção de queijo minas frescal.....	52
Figura 12. Concentração de tióis livres formados a partir da exposição da β -lactoglobulina a luz UV-C (254 nm).....	54
Figura 13. Grau de hidrólise do soro de leite controle e irradiado pelo período de 3 horas de hidrólise triptica sob condições de E/S 1:20(m/m).....	59
Figura 14. Concentração de peptídeos identificados no soro de leite hidrolisado. As digestões prosseguiram com tripsina 1:20 E/S. A figura A foi obtida a partir de β -lactoglobulina e a figuras B de α -lactoalbumina.....	61
Figura 15. Concentração de peptídeos bioativos ao longo do tempo no soro de leite. As digestões prosseguiram com tripsina 1:20 E/S. As figuras A e B foram obtidas a partir de β -lactoglobulina. Figuras C e D de α -lactoalbumina. A linha azul é referente a peptídeos.....	62

Sumário

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2. REVISAO DE LITERATURA	15
2.1. Leite	15
2.2. Proteínas do leite	16
2.3. Soro de leite	18
2.4. Peptídeos bioativos	22
2.5. Hidrólise enzimática	23
2.6. Processamento térmico	26
2.7. Processamento não térmico	26
2.7.1. Radiação ultravioleta (UV)	27
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral	29
3.2. Objetivos específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. ANÁLISE DO PERFIL DO CONSUMIDOR	30
4.2. CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE LEITE	32
4.2.1. Matéria prima	32
4.2.2. Composição química do soro de leite	32
4.2.3. Quantificação de proteína por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	33
4.3. DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO UV-C NO SORO DE LEITE	35
4.3.1. Processamento do soro de leite	35
4.3.2. Processamento não térmico: irradiação UV-C	35
4.3.3. Quantificação de tióis livres acessíveis do soro de leite submetido ao processamento UV-C	36
4.4. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO SORO DE LEITE PROCESSADO POR RADIAÇÃO UV-C	37
4.4.1. Processamento do soro de leite	37
4.4.2. Processamento não térmico: irradiação UV-C	37
4.4.3. Processamento térmico: pasteurização lenta	37
4.4.4. Análise da qualidade microbiológica	38

4.5. Análise de bioacessibilidade de minerais por ICP OES.....	38
4.6. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SORO DE LEITE IRRADIADO POR UV-C	40
4.6.1. Grau de hidrólise	40
4.6.2 Análise de peptídeos por MALDI-TOF	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. ANÁLISE DO PERFIL DO CONSUMIDOR.....	42
5.1.1. Perfil dos consumidores de produtos lácteos e hábitos de consumo	42
5.1.2. Neofobia	49
5.2. CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE LEITE	51
5.2.1. Composição química do soro de leite.....	51
5.2.2. Quantificação de proteína por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	52
5.3. DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO UV-C NO SORO DE LEITE	53
5.3.1. Quantificação de tióis livres acessíveis	53
5.4. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO SORO DE LEITE PROCESSADO E POR RADIAÇÃO UV-C	55
5.4.1. Análise da qualidade microbiológica.....	55
5.5. Análise de bioacessibilidade de minerais por ICP OES.....	57
5.6. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SORO DE LEITE IRRADIADO POR UV-C	58
5.6.1. Grau de hidrólise	58
5.6.2. Análise de peptídeos por MALDI-TOF	60
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2021 foram contabilizados mais de 31 milhões de brasileiros com 60 anos ou mais. Em 2012 os idosos correspondiam a 11,3% da população brasileira, já em 2021 eles correspondiam a 14,7%, demonstrando o envelhecimento populacional que vem acontecendo (1). O envelhecimento populacional tem implicações diretas sobre as políticas sociais, principalmente no que tange a saúde pública contemporânea. Assim, é necessária uma ampla discussão sobre meios eficazes de prevenção de doenças, para que essa população tenha uma melhor qualidade de vida (2,3).

Os idosos são muito susceptíveis ao desequilíbrio nutricional por razões socioeconômicas, fisiológicas, diminuição da percepção sensorial, doenças, entre outras. O modo de preparo do alimento desempenha um importante papel na intenção de compra, principalmente em produtos voltados para o público maior de 60 anos. Portanto, em produtos voltados para idosos, deve-se observar não só o valor nutricional do alimento, como também o custo, palatabilidade e facilidade do preparo (4). Na busca por suprir as necessidades nutricionais da população, o meio científico vem cada vez mais buscando nutrientes em fontes alimentares alternativas, como por exemplo o soro de leite que antes era descartado e agora é usado como fonte de proteína e aminoácidos essenciais (5).

A suplementação com proteína dietética é considerada fácil de administrar, o custo é relativamente baixo e pode ser aplicada em quase todas as populações em envelhecimento. Muitas dietas de suplementos nutricionais

são bem toleradas por idosos e podem resultar em aumento de ingestão diária de proteína e energia (6).

A ingestão adequada de proteínas desempenha um papel crucial na saúde e no bem-estar dos idosos, especialmente quando se trata de prevenir ou retardar condições como a sarcopenia. A sarcopenia é caracterizada pela perda progressiva de massa muscular, força e função que ocorre com o envelhecimento. As proteínas fornecem os aminoácidos necessários para a síntese proteica muscular. A ingestão adequada de proteínas estimula a síntese proteica e inibe a degradação muscular, mantendo um equilíbrio positivo das proteínas musculares (7,8).

Mundialmente, uma grande preocupação da indústria de laticínios é a utilização e/ou descarte do soro. Este produto ao ser descartado representa um importante poluente ambiental; porém quando reaproveitado é um ingrediente com constituintes valiosos, como proteínas e minerais (cálcio, fósforo, sódio e potássio). Portanto, o soro de leite tem um grande potencial para suprir a demanda por nutrientes, principalmente na população idosa (4,9–11).

Novos produtos como veículos de promoção do bem estar, saúde e redutor de riscos de doenças estão sendo constantemente inseridos no mercado devido aos avanços dos conhecimentos científicos, a necessidade do consumidor e interesses econômicos. Observa-se um aumento na busca por produtos que não só tenham importância nutricional e sensorial como também que evitem uma deficiência nutricional e/ou ajudam na redução de riscos de futuras doenças (12,13). Fatores que devem ser considerados no desenvolvimento de novos produtos para idosos são custo, palatabilidade e benefícios para a saúde (14).

A alimentação tem um importante papel no controle de doenças (15). Com o intuito de aumentar o potencial de prevenir doenças que alguns alimentos possuem surgiu o interesse em peptídeos bioativos e este pode ser obtido após tratamento por hidrólise enzimática (16–18).

Alguns dos peptídeos bioativos obtidos a partir de proteínas de soro de leite incluem α -lactorfina, β -lactorfina, albutensina A e β -lactotensina. Os peptídeos α -lactorfina e β -lactorfina foram apontados como estimuladores de contração leve nos músculos semelhante à morfina (19). Albutensina, α - e β -lactorfina parecem ter atividade inibidora da enzima conversora da angiotensina-I (ECA), sendo que inibidores da ECA são considerados peptídeos anti-hipertensivos (19,20).

Uma das maneiras para aumentar a disponibilidade de peptídeos bioativos em proteína do soro de leite é a partir da hidrólise de proteínas. A hidrólise enzimática das proteínas do soro do leite vem sendo largamente utilizada pela indústria de alimentos para melhorar as propriedades funcionais, reduzir problemas com alergenicidade e/ou produzir peptídeos bioativos. Com a utilização da hidrólise pode-se ter mudanças significativas na capacidade de geleificação, estabilidade térmica, solubilidade, capacidade de formar espuma e capacidade emulsificante (21).

Há diversas vantagens na utilização de proteases específicas, como por exemplo, a tripsina no processo de hidrólise: a especificidade; o controle da hidrólise; as condições moderadas pouco agressivas do tratamento; menor conteúdo de sais no hidrolisado final; menor formação de subprodutos; menor presença de resíduos que possam conferir alterações de sabor ou mesmo

paladar desagradável no produto final. Há diversos relatos da ação da tripsina na hidrólise da β -Lactoglobulina (β -Lg) e α -Lactoalbumina (α -La) (22).

Para garantia da segurança microbiológica do soro de leite, há diversas alternativas, sendo pasteurização um dos processos mais comuns. O conceito de pasteurização preconizado pelo *United States Department of Agriculture* (USDA) engloba os processamentos térmicos e também os processamento não térmicos (23). Segundo Butz (2002) (24) os processos não térmicos, como radiação ultravioleta (UV-C), mantém as características nutricionais e sensoriais do alimento quando comparados aos processamentos térmicos. Além disso, estudos apontam que o tratamento UV-C também melhora a digestibilidade ao modifica os perfis peptídicos derivados da quebra de proteínas do leite (25).

Dessa forma, a hipótese é que o emprego da combinação de um processamento não térmico com a hidrólise enzimática aumentará a biodisponibilidade das proteínas do soro de leite, gerando um produto com melhor perfil de peptídeos e digestibilidade do que os produtos já existentes no mercado, adequado para ser utilizado em formulações melhorando o desequilíbrio nutricional do público idoso.

6. CONCLUSÃO

Grande parte do público alvo tem hábito de consumir produtos lácteos, apesar do baixo consumo de *whey protein*, o ingrediente desenvolvido a partir de soro de leite tem potencial para ser adicionado a produtos lácteos. Nas condições estudadas, o tratamento UV-C no soro de leite foi eficiente microbiologicamente e após hidrólise enzimática houve um aumento da concentração do peptídeo bioativo ALPHMIR que é conhecido por exercer um efeito anti-hipertensivo. Dessa forma, o produto obtido tem potencial para ser um ingrediente de produtos lácteos com peptídeo bioativo, porém ainda é necessário estudos de análise sensorial para definir como este ingrediente deve ser utilizado.

7. REFERÊNCIAS

1. IBGE. População cresce. Rio de Janeiro; 2022.
2. Lima-Costa MF. Aging and public health. *Cad Saúde Pública*. 2003;19(3):700–1.
3. Paz AA, Regina B, Eidt R. Vulnerabilidade e envelhecimento no contexto da saúde. 2006;19(3):338–42.
4. Passanha A et al. Milk consumption profile in elderly people. *Rev Bras Cresc e Desenv Hum*. 2011;21(2):319–26.
5. Gupta C, Prakash D. Therapeutic Potential of Milk Whey. *Beverages*. 2017;3(31):1–14.
6. Lauque SYL, Attandier-Battandier FRAR, Mansourian ROM, Uigoz YVESG, Aintin MOP, Ourhashemi FATIN, et al. Protein-energy oral supplementation in malnourished nursing-home residents . A controlled trial. 2000;51–6.
7. Murton AJ. Muscle protein turnover in the elderly and its potential contribution to the development of sarcopenia. *Proc Nutr Soc*. 2015;74(4):387–96.
8. Kim JS, Wilson JM, Lee SR. Dietary implications on mechanisms of sarcopenia: roles of protein, amino acids and antioxidants. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2010;21(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.06.014>
9. El-salam MHA, El-shibiny S, Salem A, El-salam MHABD, El-shibiny S. Factors Affecting the Functional Properties of Whey Protein Products : A Review Factors Affecting the Functional Properties of Whey Protein Products : A Review. 2009;9129.
10. Wit JN De. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *J Dairy Sci* [Internet]. 1998;81(3):597–608. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75613-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75613-9)
11. Abreu LR. Processamento do leite e tecnologia de produtos lácteos. Lavras-MG: UFLA/FAEPE; 2005.
12. Marshall K. Therapeutic Applications of Whey Protein. 2004;9(2).
13. Thamer KG, Penna ALB. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebióticos. 2006;26(3):589–95.
14. Katsanos CS, Chinkes DL, Paddon-jones D, Zhang X, Aarsland A, Wolfe RR. Whey protein ingestion in elderly persons results in greater muscle protein accrual than ingestion of its constituent essential amino acid content. 2008;28:651–8.
15. Cheison SC, Leeb E, Letzel T, Kulozik U. Influence of buffer type and concentration on the peptide composition of trypsin hydrolysates of β -lactoglobulin. *Food Chem* [Internet]. 2011;125(1):121–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.047>
16. Kim SB, Seo IS, Khan MA, Ki KS, Nam MS, Kim HS. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. *Int Dairy J*. 2007;17(6):625–31.
17. Ferreira IMPLVO, Pinho O, Mota M V., Tavares P, Pereira A, Gonçalves MP, et al. Preparation of ingredients containing an ACE-inhibitory peptide by tryptic hydrolysis of whey protein concentrates. *Int Dairy J*. 2007;17(5):481–7.

18. Hernández-Ledesma B, Ramos M, Recio I, Amigo L. Effect of β -lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides. *J Chromatogr A*. 2006;1116(1–2):31–7.
19. Séverin S, Wenshui X. Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals : Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45:7–8.
20. Macleod A, Fedio WM, Chu L, Ozimek L. Binding of retinoic acid to β -lactoglobulin variants A and B: Effect of hepatic and tryptic digestion on the protein-ligand complex. *Milchwissenschaft*. 1996;51(1):3–7.
21. Rocha C, Gonçalves MP, Teixeira JA. Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis. *Process Biochem*. 2011;46:505–11.
22. Biasutti EAR. Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos: utilização da subtilisina e da pancreatina. Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.
23. NACMCF. Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization [Internet]. Washington, DC; 2004. Available from: https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/8d886a4d-6ddc-48c2-8b70-50bdbcd77a7f/NACMCF_Pasteurization_082704.pdf?MOD=AJPERES
24. Butz P, Tauscher B. Emerging technologies : chemical aspects. *Food Res Int*. 2002;35:279–84.
25. Hu G, Zheng Y, Liu Z, Xiao Y, Deng Y, Zhao Y. Effects of high hydrostatic pressure, ultraviolet light-C, and far-infrared treatments on the digestibility, antioxidant and antihypertensive activity of α -casein. *Food Chem*. 2017;221:1860–6.
26. IBGE. Estatística da produção pecuária [Internet]. Rio de Janeiro; 2021. Available from: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=72380>
27. Kailasapathy K. Chemical Composition, Physical, and Functional Properties of Milk and Milk Ingredients DEFINITION OF MILK AND SAFE PROCESSING OF MILK AT THE FARM MILK AS A FOOD. *Dairy Process Qual Assur*. 2016;77–105.
28. Siqueira KB. O Mercado Consumidor de Leite e Derivados O Mercado Consumidor de. Embrapa. 2019;
29. McCarthy OJ, Singh H. Physico-chemical Properties of Milk. In: *Advanced Dairy Chemistry*. New York, NY: Springer; 2009. p. 691–758.
30. Riel R. Composición y estructura físico-química de la leche. In: *Ciencia y Tecnología de la Leche*. Zaragoza: Acribia; 1991. p. 1–53.
31. Kilara A, Vaghela MN. Whey proteins [Internet]. Second Edi. *Proteins in Food Processing: Second Edition*. Elsevier Ltd.; 2017. 93–126 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00005-X>
32. Borges PFZ et al. Produção Piloto de Concentrados de Proteínas de Leite Bovino : Composição e Valor Nutritivo. *Brazilian J Food Technol*. 2001;4:1–8.
33. Roman & Sgarbieri. Obtention and chemical and nutritional characterization of different bovine casein concentrates. *Rev Nutr Campinas*. 2005;18(1):75–83.
34. Livney YD. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr Opin Colloid Interface Sci* [Internet]. 2010;15(1–2):73–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002>

35. Modler HW. Milk processing. In: Food proteins: processing applications. New York: Wiley-VCH; 2000.
36. Carter BG, Cheng N, Kapoor R, Meletharayil GH, Drake MA. Invited review: Microfiltration-derived casein and whey proteins from milk. *J Dairy Sci* [Internet]. 2021;104(3):2465–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2020-18811>
37. Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PLH, O'Mahony JA. Dairy chemistry and biochemistry, second edition. Dairy Chemistry and Biochemistry, Second Edition. 2015. 1–584 p.
38. MAPA. REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE BEBIDA LÁCTEA. 16 2005.
39. Mcsweeney PLH, Ottogalli G, Fox PF. Diversity and Classification of Cheese Varieties : An Overview [Internet]. Fourth Edi. Cheese. Elsevier Ltd; 2017. 781–808 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4/00031-4>
40. Bravo CEC, Tonial IB. Whey of milk : a valuable product. 2012;64–71.
41. Smithers GW. Whey and whey proteins-From “gutter-to-gold.” *Int Dairy J*. 2008;18(7):695–704.
42. Minj S, Anand S. Whey Proteins and Its Derivatives: Bioactivity, Functionality, and Current Applications. *Dairy*. 2020;1(3):233–58.
43. Hammann F, Schmid M. Determination and Quantification of Molecular Interactions in Protein Films: A Review. 2015;(December 2014).
44. Madureira AR, Pereira CI, Gomes AMP, Pintado ME, Xavier Malcata F. Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties. *Food Res Int*. 2007;40(10):1197–211.
45. Kinsella JE, Whitehead DM. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties j. e. 1989;33.
46. Sgarbieri VC. Revisão : Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Braz J Food Technol Prepr Ser*. 2005;185.
47. FAO. Energy and protein requirements. Geneva; 1973.
48. Sgarbieri VC. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite Physiological-functional properties of milk whey proteins. *Rev Nutr Campinas*. 2004;17(4):397–409.
49. Torres DPM. Gelificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino. Universidade do Minho; 2005.
50. Gajo AA, Abreu LR, Carvalho MS, Pinto SM, David FM. ESTUDO SENSORIAL DE QUEIJO SIMILAR UTILIZANDO AGENTE COAGULANTE E COALHO Clotting agent and rennet affecting the sensory properties of Minas Padrão -like cheese made with ewe milk. 2012;61–5.
51. Pescuma M, María E, Mozzi F, Font G, Valdez D. International Journal of Food Microbiology Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2010;141(1–2):73–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011>
52. Tesser IC, Oliveira L, Schrepp T, Naidoo S, Gama T. Preparation of cheese bread added with whey powder. *Rev Inst Laticínios Cândido Tostes*. 2010;372(65):3–8.
53. Johnson BR. Whey protein concentrates in low-fat applications. US Dairy Export Council. Arlington, VA; 2000.
54. Maroulis, Z. B. & Saravacos GD. Food Plant Economics. New York: CRC Press; 2007.

55. Hambræus L. LB. Nutritional Aspects of Milk Proteins [Internet]. Boston, MA: Springer; 2003. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_18
56. Singh H et al. Milk proteins interactions and functionality of dairy ingredients. *Aust J Dairy Technol.* 2000;55(2):71–7.
57. Jovanović S, Bara M, Ma O. Whey proteins-Properties and Possibility of Application. *Mljekarstvo.* 2005;55(3):215–33.
58. Kitts DD. Antioxidant properties of casein- phosphopeptides. *Trends Food Sci Technol.* 2005;16:549–54.
59. Mann B, Athira S, Sharma R, Kumar R, Sarkar P. Bioactive peptides from whey proteins [Internet]. *Whey Proteins: From Milk to Medicine.* Elsevier Inc.; 2018. 519–547 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00015-1>
60. Nagpal R et al. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. *Food Funct.* 2001;2(1):18–27.
61. Steijns JM. Milk ingredients as nutraceuticals. *Int J Dairy Technol.* 2001;54(3):81–8.
62. Pacheco MB, Dias NFG, Baldini VLS, Tanikawa C, Sgarbieri VC. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2005;25(2):333–8.
63. Nielsen SD, Beverly RL, Qu Y, Dallas DC. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chem.* 2017;232:673–82.
64. Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Food Sci Technol.* 2000;11:254–62.
65. VERMELHO AB, MELO ACN, SÁ MHB, SANTOS ALS, D'AVILA-LEVY CM, COURI S, et al. Enzimas Proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas. In: *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado.* Rio de Janeiro: Interciência; 2008. p. 173–287.
66. Santos LF, Koblitz MGB. Proteases. In: *Bioquímica de Alimentos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 78–103.
67. Whitcomb DC, Lowe ME. Human Pancreatic Digestive Enzymes. *Dig Dis Sci.* 2007;52:1–17.
68. Oben J, Kothari SC, Anderson ML. Journal of the International Society An open label study to determine the effects of an oral proteolytic males. *J Int Soc Sports Nutr.* 2008;5(10):1–8.
69. Dau T, Bartolomucci G, Rappsilber J. Proteomics Using Protease Alternatives to Trypsin Benefits from Sequential Digestion with Trypsin. *Anal Chem.* 2020;92(14):9523–7.
70. MAPA. Instrução normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. 2018 p. 1–10.
71. EPA. Ultraviolet disinfection guidance manual for the final long term 2 enhanced surface water treatment rule [Internet]. 2006. Available from: <http://www.epa.gov/safewater/disinfection/lt2/compliance.html>
72. Gayán E, Condón S, Álvarez I. Biological Aspects in Food Preservation by Ultraviolet Light: a Review. *Food Bioprocess Technol.* 2014;7(1):1–20.
73. López-Malo A, Palou E. Ultraviolet Light and Food Preservation. In: *Novel food processing technologies.* Madrid: CRC; 2005. p. 408–9.
74. EPA. Ultraviolet disinfection guidance manual. Washington, DC; 2003.
75. Cardoso CF. Avaliação da esterilização de filme de polietileno com

- peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta. Universidade Estadual de Campinas; 2007.
76. Unluturk S, Atilgan MR, Baysal AH, Tari C. Use of UV-C radiation as a non-thermal process for liquid egg products (LEP). *J Food Eng.* 2008;85:561–8.
 77. Hu G, Zheng Y, Wang D, Zha B, Liu Z. Comparison of microbiological loads and physicochemical properties of raw milk treated with single- / multiple-cycle high hydrostatic pressure and ultraviolet-C light. *High Press Res* [Internet]. 2015;35(3):330–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/08957959.2015.1063626>
 78. Silva JF Da, Morais AT do B, Santos WG, Ahrné LM, Cardoso DR. UV-C light promotes the reductive cleavage of disulfide bonds in β -Lactoglobulin and improves in vitro gastric digestion. *Food Res Int.* 2023;168(112729).
 79. Cavalcante KN, Feitor JF, Morais STB, Nassu RT, Ahrné LM, Cardoso D. Impact of UV-C pretreatment on β -lactoglobulin hydrolysis by trypsin: Production and bioavailability of bioactive peptides. *Int Dairy J.* 2023;142.
 80. Vidigal MCTR, Minim VPR, Moreira RT, Pires ACS, Ferreira MAM, Gonçalves ACA, et al. Translation and validation to portuguese language of food technology neophobia scale. *Cienc Rural.* 2014;44(1):174–80.
 81. Evans G, Kermarrec C, Sable T, Cox DN. Reliability and predictive validity of the Food Technology Neophobia Scale. *Appetite* [Internet]. 2010;54(2):390–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2009.11.014>
 82. Chen Q, Anders S, An H. Measuring consumer resistance to a new food technology: A choice experiment in meat packaging. *Food Qual Prefer* [Internet]. 2013;28(2):419–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2012.10.008>
 83. Matin AH, Goddard E, Vandermoere F, Blanchemanche S, Bieberstein A, Murette S, et al. Do environmental attitudes and food technology neophobia affect perceptions of the benefits of nanotechnology? *Int J Consum Stud.* 2012;36(2):149–57.
 84. Cox DN, Evans G. Construction and validation of a psychometric scale to measure consumers' fears of novel food technologies: The food technology neophobia scale. *Food Qual Prefer.* 2008;19(8):704–10.
 85. Gonçalves OM de AR. Estudo comparativo de processos de desidratação por liofilização e secagem convencional. Instituto Politécnico de Tomar; 2015.
 86. Silva K, Bolini HMA. Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto de soro ácido de leite bovino. *CiêncTecnologia Aliment Campinas.* 2006;26(1):116–22.
 87. Nielsen SS. *Food Analysis.* Gaithersburg: Aspen Publiser; 1998. 630 p.
 88. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. 1959;70–7.
 89. Silva JF Da. *Processamento UV-C de proteínas do soro do leite : Efeitos na estrutura e digestibilidade.* UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO; 2019.
 90. García-Sartal C, Romaris-Hortas V, Barciela-Alonso M del C, Moreda-Piñeiro A, Dominguez-Gonzalez R, Bermejo-Barrera P. Use of an in vitro digestion method to evaluate the bioaccessibility of arsenic in edible seaweed by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Microchem J* [Internet]. 2011;98(1):91–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2010.12.001>

91. Silveira ST, Martínez-maqueda D, Recio I, Hernández-ledesma B. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β -lactoglobulin. *Food Chem* [Internet]. 2013;141:1072–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.056>
92. Spellman D, McEvoy E, O’Cuinn G, FitzGerald RJ. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *Int Dairy J*. 2003;13(6):447–53.
93. Muniz LC, Madruga SW, Araújo CL. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: Um estudo de base populacional. *Cienc e Saude Coletiva*. 2013;18(12):3515–22.
94. BRASIL. Guia alimentar para a população brasileira. Ministério da Saúde. 2008;210.
95. BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 80, DE 13 DE AGOSTO DE 2020. Aprova o Regulamento Técnico que fixa os padrões de identidade e qualidade para o soro de leite e o soro de leite ácido. *Diário Of da União*. 2020;(Seção 1):2.
96. González-Weller D, Paz-Montelongo S, Bethencourt-Barbuzano E, Niebla-Canelo D, Alejandro-Vega S, Gutiérrez ÁJ, et al. Proteins and Minerals in Whey Protein Supplements. *Foods*. 2023;12(11):1–13.
97. Guefai FZ, Martínez-Rodríguez A, Grindlay G, Mora J, Gras L. Elemental bioavailability in whey protein supplements. *J Food Compos Anal* [Internet]. 2022;112(June):104696. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104696>
98. Neves-Petersen MT, Klitgaard S, Pascher T, Skovsen E, Polivka T, Yartsev A, et al. Flash photolysis of cutinase: Identification and decay kinetics of transient intermediates formed upon UV excitation of aromatic residues. *Biophys J*. 2009;97(1):211–26.
99. Kristo E, Hazizaj A, Corredig M. Structural Changes Imposed on Whey Proteins by UV Irradiation in a Continuous UV Light Reactor. *J Agric Food Chem*. 2012;
100. Tammineedi CVRK, Choudhary R, Perez-Alvarado GC, Watson DG. Determining the effect of UV-C, high intensity ultrasound and nonthermal atmospheric plasma treatments on reducing the allergenicity of α -casein and whey proteins. *Lwt* [Internet]. 2013;54(1):35–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.020>
101. Brownlow S, Morais Cabral JH, Cooper R, Flower DR, Yewdall SJ, Polikarpov I, et al. Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution - Still an enigmatic lipocalin. *Structure*. 1997;5(4):481–95.
102. Ewbank JJ, Creighton TE. Structural Characterization of the Disulfide Folding Intermediates of Bovine α -Lactalbumin. *Biochemistry*. 1993;32(14):3694–707.
103. Delorme MM, Guimarães JT, Coutinho NM, Balthazar CF, Rocha RS, Silva R, et al. Ultraviolet radiation: An interesting technology to preserve quality and safety of milk and dairy foods. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2020;102(May):146–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.001>
104. Koutchma T, Keller S, Chirtel S, Parisi B. Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors. 2004;5:179–89.

105. Buhler S, Solari F, Gasparini A, Montanari R, Sforza S, Tedeschi T. UV irradiation as a comparable method to thermal treatment for producing high quality stabilized milk whey. *Lwt.* 2019;105(November 2018):127–34.
106. Peng K, Koubaa M, Bals O, Vorobiev E. Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. *Food Res Int* [Internet]. 2020;137(May):109544. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109544>
107. BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 60, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Of da União.* 2019;(Seção 1):133.
108. Do Nascimento Da Silva E, Leme ABP, Cidade M, Cadore S. Evaluation of the bioaccessible fractions of Fe, Zn, Cu and Mn in baby foods. *Talanta* [Internet]. 2013;117:184–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.008>
109. Santos ACC Dos, Pallone JAL. Minerais Essenciais Em Leite E Os Avanços No Estudo Da Bioacessibilidade Por Modelos Estáticos De Digestão in Vitro. *Ciência e Tecnol Aliment o avanço da ciência no Bras.* 2022;132–50.
110. Fioravanti MIA, Milani RF, De Paiva EL, Morgano MA. Simple and fast ultrasound-assisted method for mineral content and bioaccessibility study in infant formula by ICP OES. *Anal Methods.* 2020;12(25):3225–34.
111. Cheison SC, Schmitt M, Leeb E, Letzel T, Kulozik U. Influence of temperature and degree of hydrolysis on the peptide composition of trypsin hydrolysates of β -lactoglobulin: Analysis by LC-ESI-TOF/MS. *Food Chem* [Internet]. 2010;121(2):457–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.065>
112. Zhong W, Li J, Dai J, Wang C, Zhang T. Digestibility of polymerized whey protein using in vitro digestion model and antioxidative property of its hydrolysate. *Food Biosci* [Internet]. 2021;42(May):101109. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101109>
113. Jacquot A, Gauthier SF, Drouin R, Boutin Y. Proliferative effects of synthetic peptides from β -lactoglobulin and α -lactalbumin on murine splenocytes. *Int Dairy J* [Internet]. 2010;20(8):514–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.013>
114. Faucher M, Geoffroy TR, Thibodeau J, Gaaloul S, Bazinet L. Semi-Industrial Production of a DPP-IV and ACE Inhibitory Peptide Fraction from Whey Protein Concentrate Hydrolysate by Electrodialysis with Ultrafiltration Membrane. *Membranes (Basel).* 2022;12(4).
115. Chatterton DEW, Smithers G, Roupas P, Brodkorb A. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin-Technological implications for processing. *Int Dairy J.* 2006;16(11):1229–40.