

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. REVISÃO 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.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leite

Atualmente o leite representa um dos produtos mais importantes da agropecuária brasileira, com uma produção de aproximadamente 34,84 bilhões de litros em 2019 (26) com grande importância na promoção do crescimento e desenvolvimento de crianças e animais jovens e continua sendo importante em nossas dietas durante a vida adulta como uma das principais fontes proteicas (27). O Ministério da Saúde recomenda que o consumo de leite, na forma fluida ou de derivados lácteos, para adultos acima de 20 anos, inclusive para os idosos, seja de 600 mL/dia ou 219 litros/ano. De acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o consumo médio anual de leite *per capita* no Brasil em 2018 foi de 166,4 litros (28).

O leite é uma dispersão coloidal complexa contendo glóbulos de gordura, micelas de caseína e proteínas do soro do leite em uma solução aquosa composta por lactose, minerais e alguns outros compostos menores. Suas propriedades físicas e químicas dependem de fatores composicionais e estruturais intrínsecos, assim como, fatores extrínsecos como temperatura e tratamentos pós-ordenha (29).

A composição do leite difere entre diferentes mamíferos, e entre diferentes raças da mesma espécie. No leite bovino por exemplo, os componentes majoritários são água ($\pm 86,6\%$), gordura ($\pm 4,6\%$), proteínas ($\pm 3,4\%$), lactose ($\pm 4,9\%$) e minerais ($\pm 0,5\%$); e componentes minoritários são as enzimas, vitaminas, pigmentos (carotenos, xantofilas, riboflavina), células diversas

(epiteliais, leucócitos, bactérias, leveduras) e outros elementos (dióxido de carbono, oxigênio, nitrogênio) (27,30).

2.2. Proteínas do leite

Proteínas são polímeros de alto peso molecular, onde as unidades básicas são os aminoácidos que estão ligados entre si por ligações peptídicas (31). As proteínas do leite podem ser divididas em duas frações principais: as caseínas, que estão principalmente no estado de partículas coloidais (micelas) e as proteínas do soro do leite, que estão em solução (32,33). A proporção dessas proteínas no leite pode variar dependendo de alguns fatores, como por exemplo, a fase da lactação do animal, mas em média a caseína constitui 80% da proteína total do leite (27,33). As caseínas são subdivididas em α_1 -, α_2 -, β - e κ -caseína e o soro de leite compreende a β -Lactoglobulina e α -Lactalbumina, proteose-peptona (parcialmente derivada de hidrólise de β -caseínas) e pequenas quantidades de proteínas derivadas do sangue, albumina sérica, imunoglobulina e lactoferrina conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição das proteínas do leite bovino

Proteínas		Quantidade no leite (g/L)
CASEÍNAS		24 – 28
	as1	12–15
	as2	3 – 4
	β	9 –11
	k-caseína	3 – 4
PROTEÍNAS DO SORO		5 – 7
	β -lactoglobulina	2 – 4
	α -lactalbumina	1 – 1,5
	Albumina sérica	0,1 – 0,4
	Imunoglobulinas	0,6 – 1,0
	proteoses-peptonas	1
	lactoferrina	~0,1

Fonte: Adaptada de (27,34)

Ambas frações são largamente utilizadas na indústria de alimentos na formulação de bebidas, queijos processados, fórmulas infantis, produtos para confeitarias, produtos fermentados, produtos cárneos, pastas, sopas e sobremesas. As proteínas conferem aos produtos formulados melhores propriedades sensoriais, em virtude de suas propriedades funcionais e tecnológicas, ainda agregando um alto valor nutritivo (19,35,36).

As propriedades dos produtos lácteos estão relacionadas às propriedades das proteínas do leite, embora a gordura, a lactose e os sais exerçam influência, as caseínas têm uma grande importância. O tratamento térmico a que muitos produtos lácteos são submetidos só é possível devido à estabilidade térmica excepcionalmente alta das caseínas (37). As micelas de caseína são estáveis a uma temperatura de até 140 °C (27).

2.3. Soro de leite

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea (38), o soro de leite é definido como o líquido residual obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína.

Na fabricação de queijo é fundamental que ocorra a conversão do leite líquido em um gel viscoelástico (coágulo) e este processo pode ocorrer utilizando um dos três agentes coagulantes: coalho, ácido e ácido/calor (39). Há dois tipos principais de soro de leite, sendo eles o doce e o ácido. A classificação irá variar dependendo do queijo produzido com base na relação da acidez total ou pelo conteúdo em ácido láctico. O soro doce é obtido principalmente pela coagulação enzimática (coalho) e apresenta pH entre 6,0 e 6,8. O soro ácido é formado pela coagulação ácida e apresenta pH inferior a 6,0 (40). Os queijos de coagulação enzimática representam cerca de 75% do total produção de queijo, portanto a grande maioria da produção de soro é doce (39).

Da fabricação de queijo, aproximadamente 90% do volume de leite resulta em soro, sendo que este contém cerca de metade dos sólidos do leite (37). O soro de leite já foi considerado um resíduo da indústria, porém, no século 20, com a implementação de regulamentos que impediram o descarte de soro de leite não tratado também veio o reconhecimento do valor dos seus componentes, propriedades funcionais e aplicações (41).

Na composição do soro podem ser encontrados nitrogênio não proteico, proteínas solúveis, sais minerais, vitaminas e lactose. As proteínas do leite têm um certo grau de estabilidade estrutural devido à sua estrutura globular que contém algumas pontes de dissulfeto. As frações do soro podem variar em

tamanho, peso molecular e função (42). As principais proteínas do soro são a β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina que são proteínas globulares (Figura 1).

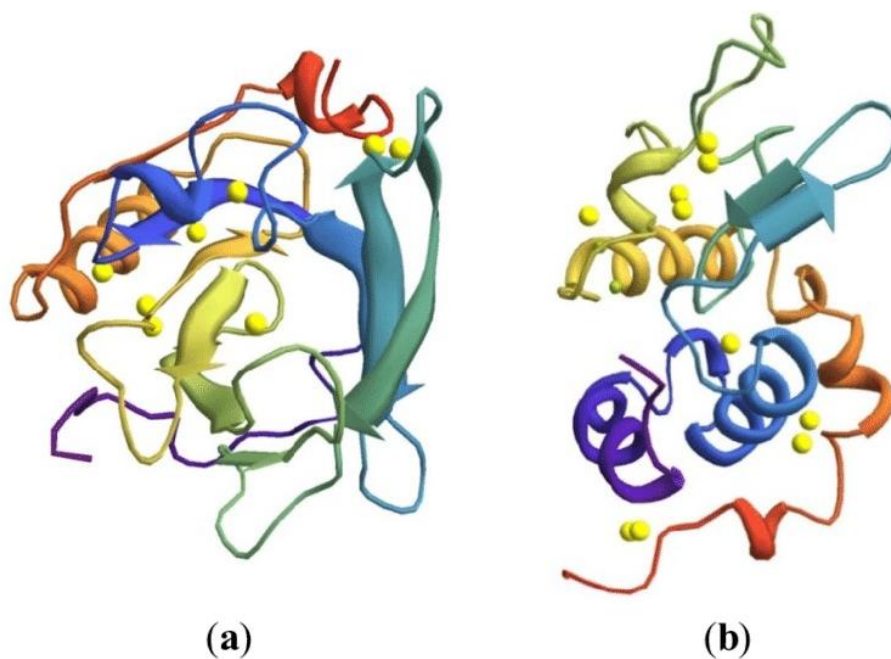


Figura 1. Estrutura terciária da (a) β -lactoglobulina e (b) α -lactalbumina.

Fonte: (43)

Na Tabela 2 estão as principais proteínas do soro de leite e suas atividades biológicas.

Tabela 2. Proteínas do soro de leite bovino e seus benefícios

Componentes do soro	Atividade Biológica
β -Lactoglobulina	Transportador de retinol, ácidos graxos, palmitato, vitamina D e colesterol Aumento da atividade da esterase pré-gástrica Transferência de imunidade passiva Regulação do metabolismo do fósforo da glândula mamária
α -Lactoalbumina	Atividade anticancerígena Metabolismo e síntese da lactose Tratamento da doença induzida por estresse crônico
Imunoglobulinas	Modulação do sistema imunológico Atividade antimicrobiana Atividade antifúngica Atividade opioide
Albumina do soro bovino	Função antimutagênica Prevenção do câncer Imunomodulação
Lactoperoxidase	Inibe o crescimento de bactérias
Lactoferrina	Ação antioxidante, antimicrobiana, antiviral e antifúngica. Promove o crescimento de bactérias benéficas

Fonte: Adaptado de (12,42,44)

As imunoglobulinas incluem a IgG, IgA e IgM, sendo que a IgG corresponde a 80% do total das imunoglobulinas de leite bovino (45,46). As proteínas do soro de leite são relativamente instáveis ao calor, ocorrendo extensa desnaturação a 80 °C. A β -lactoglobulina é mais termolábil do que a α -lactoalbumina como consequência do seu grupo sulfidril livre, que permite o início das reações autocatalíticas de troca de dissulfeto (27).

Os aminoácidos presentes no soro de leite incluem os aminoácidos essenciais, que não são produzidos pelo corpo e devem ser obtidos através da dieta, bem como os aminoácidos não essenciais, que o corpo é capaz de sintetizar por si próprio (19).

Padrões da necessidade de ingestão de aminoácidos essenciais foram estabelecidos pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e

Alimentação (FAO) (47), sendo que as proteínas do soro apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em concentração acima destas recomendações. As proteínas do soro apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina. No caso dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) que apresentam menores teores, ainda assim parâmetros estabelecidos são atendidos (48,49). Esses aminoácidos são fundamentais para diversas funções no organismo, como a síntese de proteínas, a formação de tecidos, a regulação de enzimas e hormônios, a função imunológica e a produção de neurotransmissores. Por isso, o soro de leite é considerado uma excelente fonte de proteínas completa e é amplamente utilizado em suplementos nutricionais, bebidas proteicas e produtos de nutrição esportiva devido aos benefícios que oferece para o corpo (50).

O soro de leite pode ser utilizado como ingrediente de diversos produtos, como bebidas funcionais fermentadas (51), pão de queijo (52), sopas e molhos (53), dentre outros. Com a crescente demanda por alimentos mais nutritivos, acessíveis e com menor custo de produção, o soro é cada vez mais viável para a indústria (54). Portanto, ingredientes à base de proteína láctea estão sendo amplamente utilizados no desenvolvimento de novos produtos pela indústria de alimentos devido ao seu alto valor nutricional (55).

Desde o início da década de 1980, as proteínas do soro de leite cresceram em popularidade como ingredientes não só do ponto de vista nutricional, mas também da perspectiva tecnológica. Em aplicações alimentícias, as proteínas do soro do leite e seus derivados vêm ganhando destaque devido suas diversas funcionalidades. Em relação às propriedades tecnológicas pode-se citar a

solubilidade, capacidade de retenção de água e gordura, capacidade de emulsificação e geleificação, formação de espuma e filmes comestíveis. Além disso, tem sabor mais brando quando comparadas à caseína. Estas características tornam as proteínas do soro de leite um ingrediente adequado para ser utilizado na elaboração de novos produtos (56). Por esse motivo, é de grande importância o estudo do impacto dos componentes do leite, incluindo o soro, na saúde humana, bem como sua aplicação em produtos alimentícios (12,57).

Vários produtos à base de proteína de soro de leite são produzidos por técnicas de fracionamento por membranas. Os produtos mais importantes à base de proteínas de soro de leite são concentrado de proteína de soro de leite (WPC), isolado de proteína de soro de leite (WPI) e proteína de soro de leite hidrolisada (HWP) (57).

2.4. Peptídeos bioativos

Segundo Kitts (58), os peptídios bioativos são definidos como fragmentos específicos de proteína, resistentes à ação de proteínas digestivas que tem um impacto positivo nas funções corporais, podendo influenciar na saúde.

Os peptídeos bioativos ou peptídeos biologicamente ativos são produzidos principalmente através do uso de diferentes enzimas por hidrólise enzimática. Também podem ser gerados por meio do processamento de alimentos e fermentação microbiana utilizando-se bactérias ácido láctica (42).

Os peptídeos bioativos do leite podem ser divididos em diferentes categorias com base em seu efeito fisiológico no corpo ou na proteína da qual foram derivados: anti-hipertensivos, antioxidantes, antitrombóticos, opioides,

fosfopeptídeos de caseína, antimicrobianos, citomoduladores e imunomoduladores (59)

As proteínas do leite são uma das mais importantes fontes de peptídeos biologicamente ativos (60). Estes peptídeos são comercializados de forma isolada, podendo ser utilizados em fórmulas infantis, dietas clínicas ou como agentes antimicrobianos (61,62).

O soro de leite bovino é de grande interesse biotecnológico por ter peptídeos bioativos já descritos na literatura. Foram descritos 59 peptídeos bioativos diferentes, provindos das mais diversas condições de proteólises. Dentre elas, 7 fragmentos têm sítios de clivagem preferenciais à clivagem por tripsina (63).

Para aumentar a disponibilidade de peptídeos bioativos em proteína do soro de leite, a hidrólise enzimática é uma das alternativas.

2.5. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é um processo utilizado para melhorar propriedades físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo. É empregado em macromoléculas alimentares como as proteínas, alterando as características de absorção das proteínas, sendo o método preferido para a obtenção de hidrolisados para aplicações nutricionais, como em fórmulas infantis hipoalergênicas, preparações imunoestimulantes, produtos geriátricos, dietas terapêuticas e bebidas esportivas. Além disso, a hidrólise enzimática pode liberar peptídeos bioativos (62).

A hidrólise de proteínas pode ser executada por enzimas do sistema digestivo (pancreatina, pepsina, α -quimotripsina), de origem vegetal como

papaína, por enzimas de origem microbiana, ou com ácido ou base forte, sendo que em alimentos o mais comum é a hidrólise enzimática (64).

É de grande importância a escolha da enzima proteolítica que será utilizada na hidrólise, visto que a sua ação específica vai influenciar a composição final dos produtos, principalmente em relação ao tamanho dos peptídeos (22).

As proteases, também conhecidas como peptidases ou enzimas proteolíticas, são enzimas responsáveis pela quebra de ligações peptídicas em proteínas, convertendo-as em fragmentos menores chamados peptídeos ou aminoácidos. Essas enzimas desempenham um papel crucial em vários processos biológicos, incluindo a digestão de alimentos, regulação de vias metabólicas e eliminação de proteínas danificadas ou desnecessárias. (65) .

De acordo com Santos & Koblitz (66) proteases (EC 3.4) são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas e podem atuar nas ligações éster e amida. Todas as proteases possuem um certo grau de especificidade para o substrato, geralmente baseado na sequência de aminoácidos que circundam diretamente a ligação que é clivada.

Tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase são secretadas pelo pâncreas como pró-enzimas inativas. A tripsina desempenha um papel fundamental na regulação de todas as outras enzimas digestivas, portanto uma das mais importantes enzimas digestivas. É uma endopeptidase, da classe das serina-proteases, que cliva o lado carboxila dos resíduos de arginina e lisina, seu pH ótimo de ação está entre 7,5 e 8,5. (67).

Vários fatores influenciam nas características de composição, propriedades físico-químicas, funcionais e sensoriais de hidrolisados proteicos enzimáticos. As propriedades químicas e estruturais da proteína são alguns dos fatores mais importantes. Porém, a intensidade dos processos a que tenham sido submetidos, as condições da hidrólise, especificidade da enzima proteolítica e o grau de hidrólise também desempenham um papel fundamental nas características de hidrolisados proteicos enzimáticos. As condições de hidrólise são estabelecidas com o intuito de obter um hidrolisado que tenha alto valor nutricional, sabor agradável, propriedades antigênicas e funcionalidade e também que não tenha custo elevado (68) .

O resultado da hidrólise está relacionado com o tipo de enzima, relação enzima/substrato (E/S), temperatura, pH e tempo. Cheison *et al.* (15) fez uma extensa revisão sobre soro de leite, o mecanismo e a cinética da hidrólise enzimática, as enzimas utilizadas para a hidrólise, os peptídeos deles derivados e o efeito do pré-tratamento dos substratos, nortando assim os parâmetros utilizados neste estudo.

Enzimas como a tripsina bovina são específicas para a clivagem de ligações peptídicas. Essa especificidade é caracterizada pela sua preferência por regiões positivamente carregadas contendo resíduos de arginina e lisina, devido à sua tríade catalítica (69). Na sequência primária da proteína β -lactoglobulina, foram identificados 19 locais potenciais para clivagem pela tripsina, sendo 17 lisinas e 2 argininas. (15).

2.6. Processamento térmico

Segundo a Instrução Normativa nº 76 (IN 76), de 26 de novembro de 2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é considerado leite pasteurizado o leite fluído submetido a um dos processos de pasteurização previstos na legislação vigente, envasado automaticamente em circuito fechado e destinado a consumo humano direto (70).

O tratamento térmico da pasteurização rápida se dá na faixa de temperatura entre 72 a 75 °C durante 15 a 20 segundos em pasteurizador de placas ou entre 62 e 65 °C durante 30 minutos na pasteurização lenta, em equipamento apropriado de pasteurização, ambos seguindo para o resfriamento imediato em aparelho em placas a uma temperatura igual ou inferior a 4°C e envasado em circuito fechado no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações. No Tratamento Térmico UHT (Ultra High Temperature) o líquido é rapidamente aquecido a temperaturas entre 135°C e 150°C por um curto período, geralmente de 2 a 5 segundos. Esse aquecimento rápido é crucial para eliminar microorganismos patogênicos e deteriorantes sem comprometer excessivamente as características sensoriais e nutricionais do produto. (70).

2.7. Processamento não térmico

As tecnologias não térmicas vem sendo aplicadas em alimentos como alternativa viável ao processamento térmico tradicional, visto que os tratamentos não térmicos mantém melhor as características nutricionais e sensoriais do alimento. Alguns exemplos desta tecnologia são: o campo elétrico pulsado

(CEP), processamento com luz ultravioleta (UV), processamento em alta pressão, dentre outras (24).

2.7.1. Radiação ultravioleta (UV)

Radiação ultravioleta (UV) é a parte do espectro eletromagnético entre a luz visível e os raios-X, conforme mostrado na Figura 2. A luz UV é gerada pela aplicação de uma diferença de potencial numa lâmpada que gera uma descarga elétrica dentro de um tubo de quartzo contendo uma mistura de gás (mercúrio ou xênon), o que excita esses átomos. Quando os átomos voltam ao seu estado original de energia, emitem luz em um comprimento de onda de 100 nm a 400nm (71).

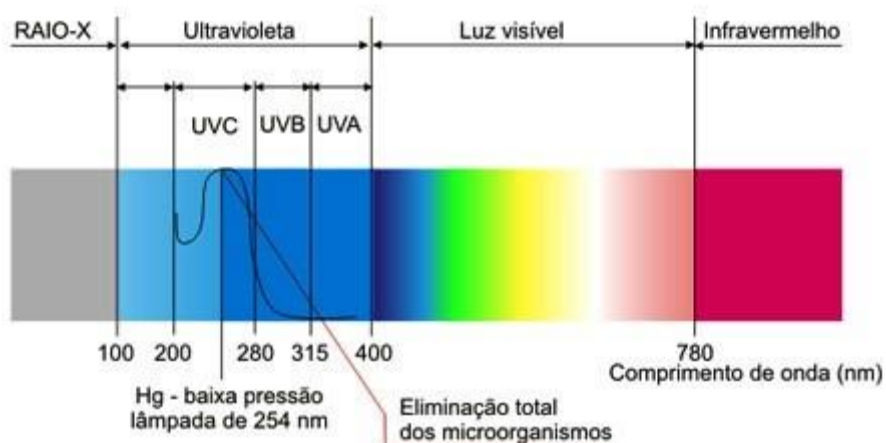


Figura 2. Espectro de luz

Fonte: Food Safety Brazil, 2016

A radiação UV pode ocorrer em ondas curtas (UV-C) - 200 a 280 nm, ondas médias (UV-B) - 280 a 320 nm ou ondas longas (UV-A) - 320 a 400 nm. Para conservação de alimentos a região UV-C é considerada a mais eficiente, pois corresponde ao comprimento de onda mais absorvido pelo DNA. As

radiações UV-C são absorvidas pelas proteínas e ácidos nucleicos, provocando o rompimento de cromossomos, mutações genéticas e inativação de enzimas e, conseqüentemente, a morte da célula (72,73)

A radiação UV-C atua como um agente sanificante físico se for utilizada com intensidade e por tempo de exposição suficiente, funcionando como germicida, eliminando bactérias, bolores, leveduras e vírus, não deixando resíduos nas superfícies aplicadas (74,75). O tratamento com luz UV-C tem sido utilizado na indústria de alimentos para diferentes fins, incluindo sanitização do ar no processamento de carnes e vegetais, redução de microrganismos patogênicos no processamento de carnes vermelhas, aves e peixes. Além disso, já foi aplicada com sucesso na pasteurização de alimentos líquidos, como sucos de fruta e leite (76).

Hu et al. (77) estudaram o efeito da radiação UV-C na carga microbiana e propriedades físico-químicas de leite bovino e concluiu que o tratamento UV-C diminui significativamente a carga de microrganismos no leite cru. Um posterior estudo dos mesmos autores demonstrou que o tratamento UV-C resultou em melhor digestibilidade *in vitro* e modificou os perfis peptídicos da α -caseína do leite bovino, que geralmente leva ao aumento das atividades antioxidantes e anti-hipertensivas (25). Portanto, o tratamento UV-C é promissor tanto controle microbiológico quanto na modificação de proteínas alimentares, aumentando sua digestibilidade, podendo produzir produtos lácteos com melhores propriedades funcional.

O trabalho de Silva (78) mostrou como o uso da luz contínua na região UV-C altera a estrutura secundária da β -Lactoglobulina, apontando uma diminuição da

alergenicidade em idosos utilizando a simulação do processo de digestão gástrica.

Cavalcante *et al.* (79) compararam os efeitos da irradiação por UV-C com o processo térmico em proteína isolada do soro de leite, avaliando mudanças conformacionais na β -lactoglobulina, grau de hidrólise (DH) trípica e perfil de peptídeos. Foi observado um aumento significativo na constante de velocidade de hidrólise da β -Lg irradiada com luz UV-C, em comparação a proteína nativa e processada termicamente, sugerindo que os sítios de clivagem na cadeia proteica se encontram mais expostos. Nos hidrolisados trípitos da β -Lg, irradiada com luz UV-C, foram encontrados seis peptídeos bioativos, $f_{\beta-LG}$ (f_{31-36} , f_{57-76} , f_{87-91} , f_{91-99} , $f_{118-121}$, e $f_{158-164}$).

Os trabalhos mais recentes e integrantes do projeto multitemático a qual este projeto pertence focaram no estudo da luz UV-C na proteína do soro de leite isolada (78,79). Desta forma, dando continuidade ao projeto e focando na aplicação prática, este estudo teve como matéria prima o soro de leite proveniente de uma indústria. Assim, as possíveis alterações estruturais nas proteínas do soro do leite decorrentes da ação da luz UV-C combinada com hidrólise enzimática foram estudados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar as modificações na estrutura das proteínas majoritárias do soro de leite causadas pelo tratamento UV-C e hidrólise.

3.2. Objetivos específicos

- Traçar o perfil e hábitos de consumo do público idoso em relação a produtos lácteos
- Avaliar as mudanças estruturais na conformação das proteínas de soro de leite tratado com luz UV-C e hidrólise enzimática
- Analisar o perfil peptidômico de hidrolisado proteico proveniente deste soro
- Desenvolver um ingrediente a partir do soro de leite com peptídeos bioativos direcionado ao público idoso.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto é parte integrante do Projeto de Pesquisa Temático processo nº 2017/01189-0 (*Novel aging: Technologies and solutions to manufacture novel dairy products for healthy aging*), financiado pela FAPESP e realizado em parceria entre Embrapa Pecuária Sudeste, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Universidade Estadual Paulista (FCFAR/UNESP) e Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo (IQSC/USP).

4.1. ANÁLISE DO PERFIL DO CONSUMIDOR

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Centro Universitário Central Paulista – UNICEP, protocolo CAAE 39668920.8.0000.5380 e os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo I).

Foi realizado um estudo de perfil e hábitos de consumo do público alvo (idosos) com o objetivo de identificar necessidades e preferências deste público

com a participação de 296 pessoas. Foi elaborado um questionário contendo 23 perguntas (Anexo II) pela plataforma *google forms* contendo questões sócio demográficas (sexo, faixa etária, escolaridade, renda, qualificação profissional, etc); análise sobre hábitos de consumo de produtos lácteos (frequência de compra e de consumo, local de compra, percepção dos preços e critérios de escolha de acordo com a ocasião) e preferência em relação a produtos lácteos (qualidade, aparência, modo de preparo). Também foi utilizado questionário sobre posicionamento em relação a novas tecnologias em produtos alimentícios e neofobia em relação a tecnologia de alimentos (FTNS), traduzido e validado para o português por Vidigal et al. (80) a partir do original em inglês (81). Este questionário é composto por treze afirmações em uma escala estruturada de 7 pontos, com uma adaptação para uma escala de 5 pontos, devido a uma dificuldade de visualização no celular caso fosse utilizada a escala original de 7 pontos, tendo em vista a forma *online*. Cabe ressaltar que a escala de 5 pontos já foi utilizada com sucesso por outros autores (82,83).

No questionário foram apresentadas instruções para os consumidores responderem a escala constituída por 13 itens sendo seis deles referentes a “novas tecnologias são desnecessárias”, quatro à “percepção de risco”, dois a “escolhas saudáveis” e um item à “informação fornecida pela mídia”. Utilizando a escala de 5 pontos (1= discordo totalmente, 3 = Nem concordo, nem discordo, 5 = Concordo totalmente) os consumidores deveriam indicar o grau de concordância com cada afirmação e pensar em novas tecnologias de alimentos de um modo geral. Para realizar as análises estatísticas, as pontuações das questões 6, 7, 8 e 13 foram invertidas, de forma que valores maiores correspondem a maior neofobia.

Assim, os participantes foram classificados em baixo ou neofílicos, médio ou neutros e alto ou neofóbicos em relação à tecnologia de alimentos (83,84).

Por um período de 6 meses o questionário definitivo foi enviado, por meio de mídias sociais (*e-mail, Instagram e WhatsApp*) a pessoas residentes em várias regiões brasileiras. Os dados foram coletados diretamente do *google forms* e submetidos à análise descritiva de frequência. Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico BioEstat versão 5.0.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE LEITE

4.2.1. Matéria prima

O soro doce da produção de queijo minas frescal foi obtido de um laticínio local de pequeno porte (Laticínio Bonura, São Carlos – SP) e coletado imediatamente após a produção do queijo. O soro foi transportado em recipiente térmico e então congelado para liofilização.

As amostras foram congeladas abaixo de -18°C de modo que toda a água presente estivesse no estado sólido e abaixo do ponto triplo da água, para que não houvesse formação de espuma durante a aplicação do vácuo (85) e então liofilizadas em pressão igual a 10^{-1} mbar e temperatura do condensador -40°C (Liofilizador L108, Liotop). Após a liofilização as amostras foram embaladas em frascos rígidos, escuros de maneira a impedir a incidência de luz e armazenadas em temperatura ambiente (86).

4.2.2. Composição química do soro de leite

A composição do soro de leite liofilizado foi determinada segundo os métodos descritos na AOAC (1995). A umidade foi determinada por secagem a

105° C até peso constante; as cinzas por incineração, em mufla a 550 °C; as proteínas foram determinadas pelo método de Kjeldahl (87). As determinações de teor dos minerais (cálcio, magnésio, fosforo, potássio e sódio) foram realizadas por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido (ICP-OES, Agilent Technologies, Modelo 5110, Synchronous Vertical Dual View, Mulgrave, Australia). O instrumento foi operado nas seguintes condições: potência de radiofrequência 1,20 kW; vazão do gás do plasma 12,0 L min⁻¹; vazão do gás auxiliar 1,0 L min⁻¹; vazão do gás de nebulização 0,7 L min⁻¹; velocidade da bomba peristáltica 12 rpm; tempo de estabilização 15s, tempo de integração de sinal 3s; câmara de nebulização ciclônica duplo passo; nebulizador OneNeb I, posição de visualização axial (Fe, P) e radial (Ca, K, Mg e Na); analitos e linhas de emissão Ca (422.673 nm), Fe (259.940 nm), K (769.897 nm), Mg (280.270 nm), Na (589,60 nm), P (213.618 nm). Argônio, com pureza de 99,999% (White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brazil), foi usado para a geração do plasma, nebulização das amostras e como gás auxiliar do plasma. Para preparação das amostras para análise foram digeridas em bloco digestor, em meio ácido nítrico e diluídas para atender às exigências em relação ao máximo teor de sólidos dissolvidos aceitos pelo instrumento (< 3%).

4.2.3. Quantificação de proteína por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A α -lactalbumina e β -lactoglobulina no soro de leite foram identificadas e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) sendo utilizado um cromatógrafo modelo SDP-M20A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), equipado com sistema de injeção automático, bombas

modelo LC20AD e utilizando detector de arranjo de diodos modelo SDP-M20A. Utilizou-se uma coluna C18 modelo Aeris PEPTIDE XB-C18, 3,6 μ (150 x 2,1 mm), Phenomenex.

As fases móveis consistiram de acetronitrila com 0,1% de ácido trifluoroacético (fase A) e água *Milli-Q*® com 0,1% de ácido trifluoroacético (fase B). A fase móvel começa a 10% B (1 min), de 10% B a 60% B (44 min), 60% B isocrática (5 min), de 60% a 10% B (2 min), 10% B isocrático (3 min). O tempo total de execução foi de 55 min, tendo um fluxo da fase móvel foi de 0,3 mL / min.

O volume de injeção foi de 5 μ L e a temperatura da coluna mantida em 21 ± 2 ° C. Para a injeção todas as amostras foram analisadas em triplicata e diluídas em tampão fosfato 0,01M (FI = 0,16M e pH = 6,67) filtradas com membrana em Polietersulfona (PES) modificada com diâmetro de poro de 0,20 μ m (SC QUÍMICA, São Paulo, Brasil). Os cromatogramas foram processados em um comprimento de onda fixo de 280 nm.

A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas comparando o espectro UV-Vis, tempos de retenção e áreas de pico das amostras com os respectivos padrões α -Lactoalbumina de leite bovino Tipo III, $\geq 85\%$ PAGE (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e β -Lactoglobulina de leite bovino $\geq 90\%$ PAGE (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) nas mesmas condições cromatográficas

Para quantificação, uma curva padrão foi construída nas seguintes faixas de concentração para as proteínas: 0,2–0,5 mg/mL (α -L) sendo a equação da reta $y = 1,86E+06x - 6,22E+04$ e 0,6–1,5 mg/mL (β -L) sendo a equação da reta $y = 9,75E+05x - 8,79E+04$. O coeficiente de determinação

(R²) para as curvas padrão foi estabelecido em no mínimo 97%.

4.3. DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO UV-C NO SORO DE LEITE

4.3.1. Processamento do soro de leite

O soro de leite liofilizado foi diluído em água *Milli-Q*® na proporção de 66 mg/mL.

4.3.2. Processamento não térmico: irradiação UV-C

A amostra de soro de leite liofilizado e reconstituído foi colocada em uma cubeta de quartzo com capacidade para 15 mL e foi exposto à irradiação UV-C em bancada fotoquímica com uso de LED 255W (Thorlabs), com a emissão centrada em 254nm e potência controlada com um gerador de corrente variável (Figura 3). A amostra ficou em constante agitação por 5 horas e alíquotas foram retiradas de 100µL hora em hora para quantificação de tióis livres acessíveis (descrito no item 4.3.3). A irradiação foi feita em triplicata e a cada hora foram retiradas 3 alíquotas para análise de tióis livres.



Figura 3. Esquema processamento UV-C no soro de leite liofilizado e reconstituído

Fonte: Autoria própria, 2021

4.3.3. Quantificação de tióis livres acessíveis do soro de leite submetido ao processamento UV-C

A quantificação de tióis livres acessíveis ao ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) foi realizada baseando-se no método de Ellman (88). A concentração de tiol livre foi medida a partir da absorvidade molar do TNB, $\epsilon_{\text{TNB}} = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH = 8 contendo 1 mM de EDTA e $\lambda_{\text{Abs}} = 412 \text{ nm}$. Para a medida de absorbância, um volume de 250 μL de cada uma das amostras foi adicionado a 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH = 8 contendo 1 mM de EDTA e 50 μL de solução 2 mg ml^{-1} de DTNB preparada no mesmo tampão. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 15 min e então foi realizada a medida de absorbância em 412 nm usando um espectrofotômetro UV/VIS (ThermoFisher Scientific, Vartaa, Finlândia). Na cubeta de referência, a amostra foi substituída por água *Milli-Q*®. As amostras foram medidas antes da irradiação UV e em diferentes tempos. Calculou-se a concentração de grupos sulfidrilas livres pela lei de Lambert – Beer, considerando-se os fatores de diluição.

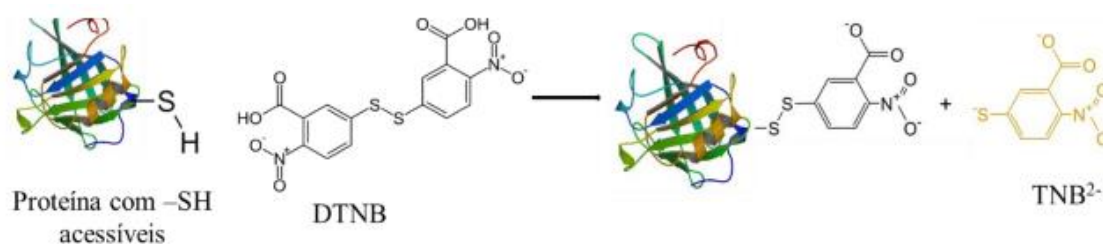


Figura 4. Reação do DTNB com tióis livres acessíveis ao solvente em proteínas e formação do TNB²⁻

Fonte: (89)

4.4. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO SORO DE LEITE PROCESSADO POR RADIAÇÃO UV-C

4.4.1. Processamento do soro de leite

O soro de leite liofilizado foi diluído em água *Milli-Q®* na proporção de 66 mg / mL e submetido a dois processamentos: 1) térmico por pasteurização lenta e 2) não térmico por UV-C, descritos a seguir. Soro de leite sem tratamento foi utilizado como controle. Para determinação da eficiência microbiológica do processamento UV-C, este foi comparado com o soro sem tratamento (controle) e o soro pasteurizado.

4.4.2. Processamento não térmico: irradiação UV-C

O soro de leite liofilizado e reconstituído foi processado por irradiação UV-C por 4 horas conforme estabelecido pelo resultado da análise de tióis livres.

4.4.3. Processamento térmico: pasteurização lenta

Foi realizada pasteurização lenta do soro de leite, frascos fechados contendo 15ml de soro foram colocados em banho-maria com temperatura controlada (62 – 68°C) durante 30 minutos e em seguida foram resfriados em banho de gelo até atingirem a temperatura de 5°C. O processamento foi realizado em triplicata.

4.4.4. Análise da qualidade microbiológica

As amostras de soro de leite liofilizado e reconstituído controle, processado por pasteurização e por UV-C foram analisadas quanto a concentração de alguns microrganismos.

Para a determinação da contagem bacteriana total, contagem de *Enterobacteriaceae* e bactérias lácticas nas amostras de soro de leite dos tratamentos estudados foram feitas diluições seriadas (em água peptonada estéril 0,1%) das amostras. Para a contagem total de bactérias, as amostras foram semeadas em ágar soja triptona (TSA) e incubadas em triplicata a 37° C por 24 h em câmara de temperatura controlada. Para *Enterobacteriaceae* e bactérias lácticas as amostras foram semeadas por *pour plate* em triplicata em Ágar Bile Violeta Vermelha (RVG) a 37 ° C por 24 h e em ágar MRS a 37 ° C por 48 horas, respectivamente (ISO 4832:2006).

4.5. Análise de bioacessibilidade de minerais

Para análise de bioacessibilidade dos minerais (Ca, Mg, P, S, Fe, Zn, Cu e Mn) primeiramente foi feito o ensaio *in vitro* baseado no método desenvolvido por (90) com algumas modificações. Para este ensaio, aproximadamente 10 mL do soro de leite liofilizado e reconstituído (66mg/mL) e do soro irradiado na mesma concentração foram adicionados a um tubo Falcon de 50 mL e o pH ajustado a 2 com HCl 6 mol L⁻¹ sob agitação por 10 min. Para a etapa de digestão gástrica, 0,6 g de solução de pepsina (1,6 g dissolvido em 0,1 mol L⁻¹ HCl) foi adicionada e submetida a aquecimento a 37°C por 2 h sob constante agitação a 200 rpm. As amostras foram colocadas em banho de gelo, para interromper a atividade enzimática e o pH da solução ajustado a 7 com NaOH 1 mol L⁻¹. Para

a etapa de digestão intestinal, uma alíquota de 5 mL da solução intestinal (0,4% (m v⁻¹) de pancreatina além de 2,5% (m v⁻¹) de sais biliares dissolvidos em 0,1 mol L⁻¹ de NaHCO₃) foram adicionadas às amostras. A solução retornou ao aquecimento por mais 2 h a 37°C e 200 rpm. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho de gelo de 15 min e transferidas para tubos de polipropileno. A mistura foi centrifugada por 10 min a 3600 rpm, sendo obtida a fração bioacessível. Parte da fração bioacessível foi coletada para análise de transporte celular usando células de Caco-2, a outra porção foi mantida a -20 °C para posterior decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas e quantificação dos analitos em triplicata por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES).

A bioacessibilidade (%) das amostras é determinada para cada teste de digestão conforme a seguinte equação.

$$\text{Bioacessibilidade (\%)} = \left[\left(\frac{C_{bio}}{C_{total}} \right) \right] \times 100$$

Onde:

C_{bio} é a concentração de analito final obtida a partir da digestão com fluidos gastrointestinais.

C_{total} é a concentração de analito inicial obtida a partir da digestão ácida em micro-ondas.

Os cálculos e análises estatística foram realizados utilizando os softwares Origin 8.5 e Excel.

4.6. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SORO DE LEITE IRRADIADO POR UV-C

As amostras de soro de leite controle e irradiada por 4 horas foram submetidas a um processo de hidrólise utilizando-se a enzima proteolítica tripsina bovina (Sigma Aldrich, EC-232-650-8) como descrito por Cavalcante et al. (79) para proteína concentrada/isolado de soro de leite. A enzima foi solubilizada em meio aquoso com 1mM HCl e mantida em refrigeração (2°C) por 24h antes do experimento.

O pH das amostras foi ajustado a 8,0 por adição de NaOH 1 M, então foi adicionada a tripsina a uma proporção enzima-substrato (E/S) de 1:20 (p/p) e a hidrólise foi realizada a 37° C por 3 h com agitação constante (15). Alíquotas de 100µL foram retiradas a cada 30 minutos para análise de grau de hidrólise conforme descrito no item 4.5.1. Parte da alíquota retirada foi armazenada em freezer biológico (-80°C) para análise de espectrometria de massa descrita no item 4.5.2. Para parar a reação a amostra foi aquecida a 95° C por 15 min, garantindo a completa inativação da enzima (91).

4.6.1. Grau de hidrólise

O grau de hidrólise foi quantificado pela metodologia o-phthaldialdehyde/ N-acetyl-L-cysteine (OPA/NAC) segundo Spellman et al., (2003). O reagente OPA/NAC (100 mL) foi preparado com 10 mL de 50 mm OPA (em metanol), 10 mL de NAC de 50 mm, 5 mL de SDS a 20% (p/v) e 75 mL de tampão borato (0,1 M, pH 9,5). O reagente foi coberto com papel alumínio para proteger da luz e deixado em agitação por pelo menos 1 h antes do uso. O ensaio de OPA foi realizado pela adição de 20µL de amostra (ou padrão) para 1 mL de OPA/NAC reagente. A absorbância desta solução foi medida a 340 nm com um Ultraspec

2000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra). Os valores de absorção para o interação de grupos amino com OPA foram feitas após 2 min para o soro de leite não hidrolisado e após 10 min para o soro hidrolisado. O grau de hidrólise foi calculado de acordo com a seguinte equação.

$$GH (\%) = \frac{(ABS \times 1,934 \times d)}{c}$$

Onde, ABS é a absorvância das amostras; 1,934 é o fator de correção da absorvidade das proteínas do soro de leite; d é o fator de diluição; e c, a concentração proteica da amostra (g.L^{-1})

Foi realizada análise de variância (ANOVA) utilizando o programa estatístico XLSTAT 2012, tendo como efeito fixo o tratamento do soro de leite para determinar diferenças significativas do tempo de hidrólise e tratamento do soro de leite, seguido do teste de Tukey, caso houvesse diferença significativa ao nível de 5%.

4.6.2 Análise de peptídeos por MALDI-TOF

O estudo do perfil de peptídeos produzidos por tempo de hidrólise foi realizado pela análise de espectrometria de massas com ionização por dessorção a laser assistida por matriz, usando um espectrômetro de massas com analisador por tempo de voo (MALDI-TOF/TOF) modelo ultraflex III (Bruker Daltonics). Para tanto, 1 μL da amostra a ser analisada foi co-cristalizada na proporção 1:1 (v/v) com a matriz α -cyano-4-hydroxycinnamic Acid (HCCA) (solução de 10 mg mL^{-1} em 50% de acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido trifluoroacético) diretamente na placa de MALDI. Foi registrado a Impressão Digital do Mapa Peptídico de todas as amostras na faixa de 500-3500 m/z.

Os dados obtidos foram tratados pelo software *FlexAnalysis* 4.0, onde foram aplicados os filtros de *smooth* e *baseline* e os espectros exportados para o software *BioTools* 4.0. As informações de clivagens teóricas foram coletadas do banco dados Mascot (Matrix Science), considerando hidrólise com tripsina e assumindo-se uma exatidão $< 0,3$ Da. A busca por peptídeos bioativos foi efetuada conforme o descrito por Nielsen et al. (63).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE DO PERFIL DO CONSUMIDOR

Participaram deste experimento 296 pessoas acima de 50 anos ou que convivem com idosos (60+). Para as análises, foram excluídas as respostas de pessoas abaixo de 50 anos que não estavam dispostos a responder com base na opinião do idoso. Sendo assim, foram obtidas 286 respostas válidas.

5.1.1. Perfil dos consumidores de produtos lácteos e hábitos de consumo

Neste estudo, a maioria dos entrevistados foram do sexo feminino (71,7%), casados (56,3%), pós graduados (53,5%), moradores da região sudeste (73,8%) e com renda familiar entre 5 a 10 salários mínimos (25,9%). Ao avaliar os fatores socioeconômicos somente dos entrevistados que afirmaram que consomem *whey protein* foi observado que embora seja um produto com alto valor agregado há pessoas de todos os níveis salariais analisados que consomem o produto.

Tabela 3. Frequência (%) dos fatores socioeconômicos dos entrevistados e dos consumidores de *whey protein*

Fatores socioeconômicos	Total entrevistados (n=286)	Consumidores <i>whey protein</i> (n= 44)
GÊNERO		
	Frequência (%)	Frequência (%)
Masculino	28,32	34,09
Feminino	71,68	65,91
ESTADO CÍVIL		
	Frequência (%)	Frequência (%)
Solteiro(a)	21,33	20,45
Casado(a)	56,29	61,36
Separado(a)	15,38	11,36
Viúvo(a)	5,59	6,82
União estável	1,40	-
ESCOLARIDADE		
	Frequência (%)	Frequência (%)
Ensino Fundamental	2,45	4,55
Ensino médio	8,39	11,36
Ensino superior	35,66	38,64
Pós graduação	53,50	45,45
REGIÃO		
	Frequência (%)	Frequência (%)
Norte	0,35	-
Nordeste	5,24	6,82
Centro-Oeste	11,19	18,18
Sudeste	73,78	75,00
Sul	9,44	-
RENDA		
	Frequência (%)	Frequência (%)
Menos de 2 salários mínimos	9,44	13,64
De 2 a 3 salários mínimos	15,38	20,45
De 3 a 5 salários mínimos	15,38	11,36
De 5 a 10 salários mínimos	25,87	27,27
De 10 a 20 salários mínimos	24,48	18,18
De 20 salários mínimos	9,44	9,09

Dentre as pessoas acima de 50 anos que responderam o questionário, a maioria (73,8%) era responsável pelas compras da casa e, portanto conhecem os diferentes produtos alimentícios disponíveis no mercado. Para que pessoas abaixo de 50 anos pudessem responder as questões era obrigatório que fizessem compra para algum idoso (60+) e conhecessem seus hábitos de

consumo; em sua maioria, essas pessoas são filhos (43,3%) ou netos (28,3%) do(a) idoso(a).

Em relação aos fatores que influenciam na compra de produtos alimentícios, de maneira geral, os fatores sabor, odor e aparência agradável; qualidade higiênico-sanitária e saudabilidade foram os fatores em que os consumidores mais concordaram sobre sua importância, como pode ser observado na Figura 5. Somando as respostas “concordo” e “concordo totalmente” a importância dos fatores seguiu a seguinte ordem: qualidade higiênico-sanitária (96,2%), sabor, odor e aparência agradável (95,8%), saudabilidade (90,6%), preço adequado em relação a qualidade do produto (89,5%), facilidade de consumo/preparo (82,2%), embalagem fácil de abrir (80,4%) e ter inovação na tecnologia aplicada (57,8%). Assim, pode-se inferir que a inovação tecnológica em produtos alimentícios não é tão importante para os consumidores quanto os demais fatores.

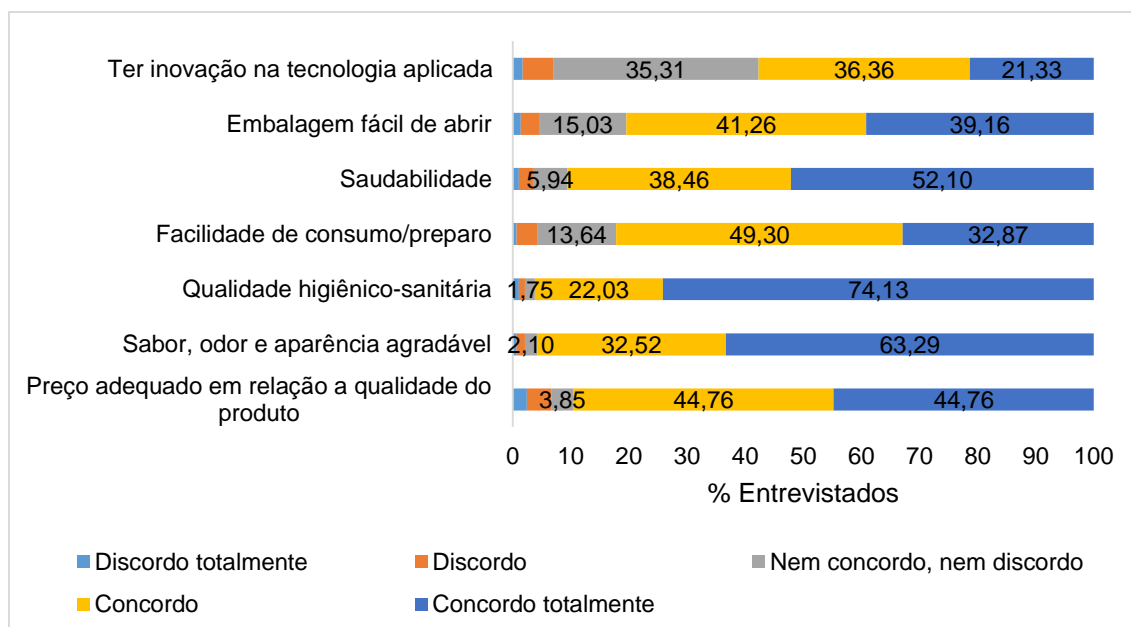


Figura 5. Frequência dos fatores de importância na compra de produtos alimentícios

Ao serem questionados sobre tecnologia aplicada na fabricação de produtos alimentícios, 46,5% concordaram que prestam atenção nas informações da embalagem, 33,9% concordaram que isto afeta sua decisão de compra e 32,9% concordaram que pagariam mais por um produto com inovação na tecnologia aplicada, porém 39,5% foram indiferentes em relação a pagar mais por tal produto (Figura 6).

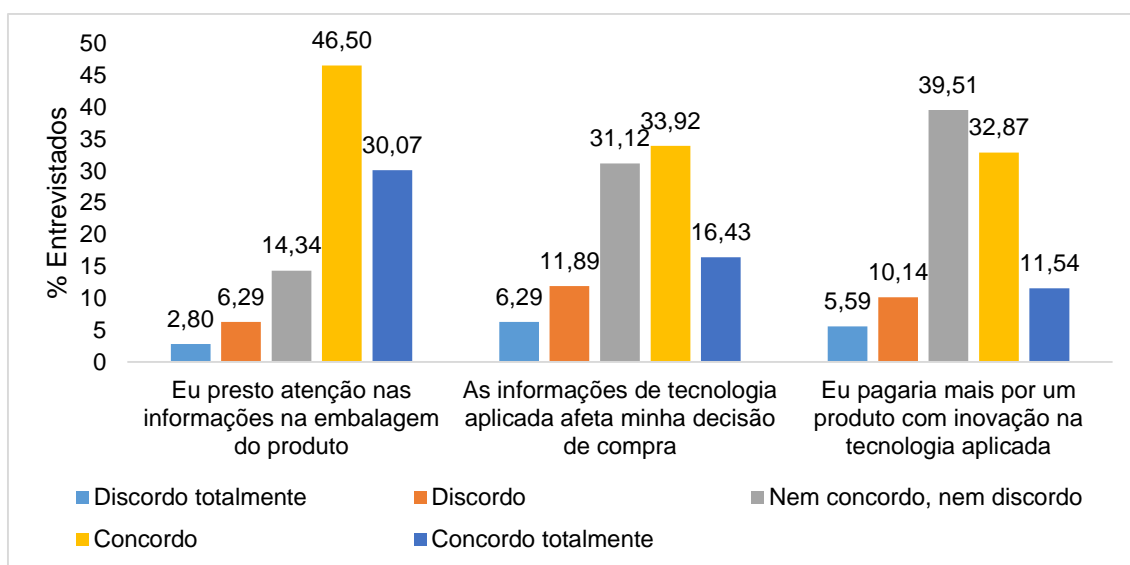


Figura 6. Frequência dos fatores relacionados a tecnologia aplicada em alimentos, utilizando escala Likert.

A Figura 7 correlaciona a resposta para a pergunta “Em relação a tecnologia aplicada na fabricação de produtos alimentícios: Eu pagaria mais por um produto com inovação na tecnologia aplicada” com a renda destes entrevistados. Dentre os entrevistados houve pessoas que concordaram com tal afirmação em todas as faixas de renda. Dos entrevistados com renda de 2 a 3 salários mínimos 36,36% concordaram com esta afirmação e com renda de 10 a 20 salários mínimos 37,14% concordaram com a afirmação. Já nas demais categorias de renda houve um maior número de entrevistados que responderam que nem concordam e nem discordam da afirmação.

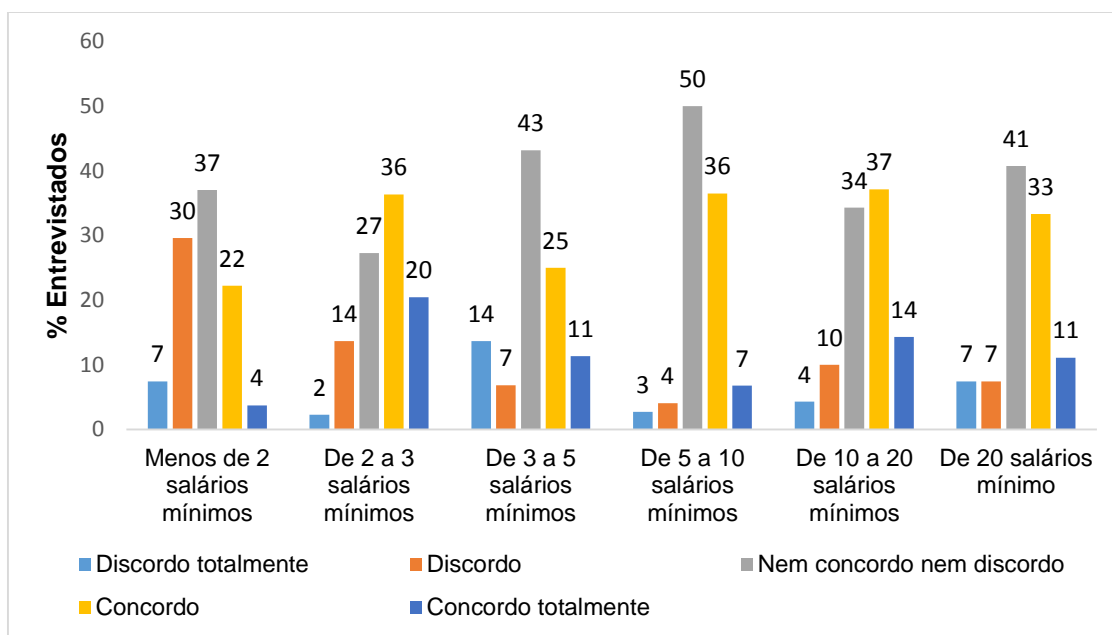


Figura 7. Porcentagem de entrevistados que pagariam mais por produtos com tecnologia aplicada e suas rendas

A grande maioria dos respondentes têm o hábito de consumir produtos lácteos (96,9%) e grande parte considera muito importante (47,9%) ou extremamente importante (22,4%) incluir tais produtos na dieta. Em um estudo realizado em Pelotas-RS por Muniz et al. (93) observaram que o consumo de leite e/ou derivados é 1,7 vezes maior na população idosa, porém Passanha (4) ao estudar o consumo de leite na população idosa brasileira observou uma ingestão média diária (275,50mL) abaixo do preconizado pelo guia alimentar. De acordo com o Guia Alimentar para a População Brasileira, publicado pelo Ministério da Saúde (94), a recomendação de ingestão média diária de leite e derivados varia de acordo com a faixa etária. Para adultos, inclusive idosos, a recomendação é de 3 porções de leite ou derivados por dia, sendo que uma porção equivale a cerca de 200 mL de leite ou 1 pote de iogurte natural. Porém, vale ressaltar que essas são apenas diretrizes gerais e as necessidades

individuais podem variar para cada indivíduo.

Dentre os produtos lácteos, 35,3% dos respondentes consomem leite fluido e 30,8% consomem queijo uma ou mais vezes por dia. Já os produtos que tiveram uma menor frequência de consumo, com a maioria de respostas 'nunca consome' foram: leite em pó (44,4%), bebida láctea (40,6%), *petit suisse* (65%), sobremesa láctea (65%) e *whey protein* (77,3%) (Figura 8), assim pode-se inferir que estes não são produtos com grande apelo para o público alvo.

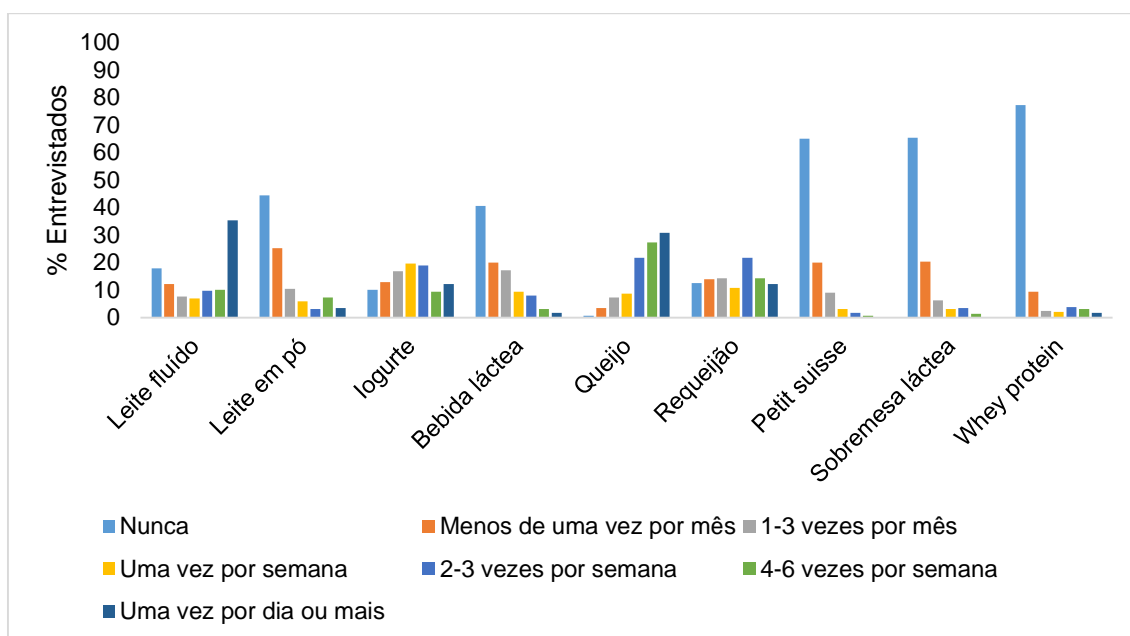


Figura 8. Distribuição da frequência de consumo de produtos lácteos

Ao serem questionados sobre o motivo de consumirem produtos lácteos um grande número de consumidores concordaram ou concordaram totalmente que é um produto familiar (74,12%), saudável (77,62%), que gostam (93,71%) (Figura 9).

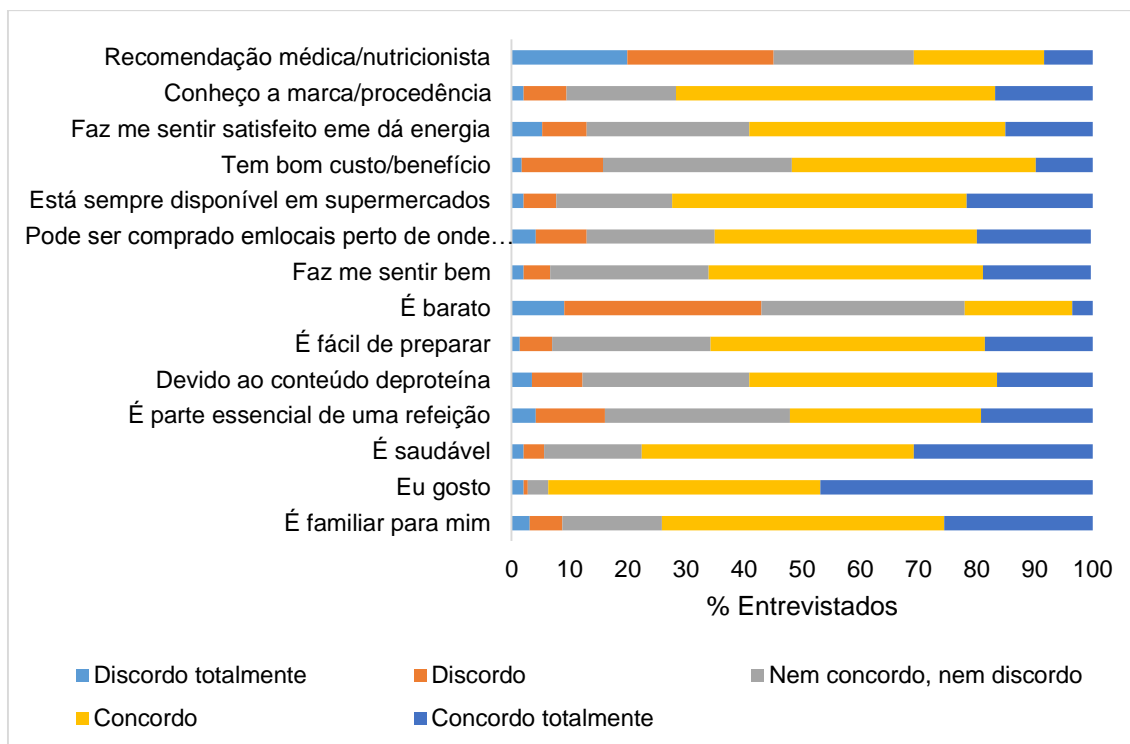


Figura 9. Frequência dos motivos relacionados ao consumo de produtos lácteos, utilizando escala Likert.

Apesar de haver poucos entrevistados que tem o hábito de consumir *whey protein*, uma boa parcela deste grupo (72%) conhecem ou já ouviram falar do produto e 15,4% consome regularmente. Na Figura 10 observamos alguns dos motivos pelo qual as pessoas ingerem *whey protein*, mas o fator que mais motiva o consumo foi a prática de atividade física.

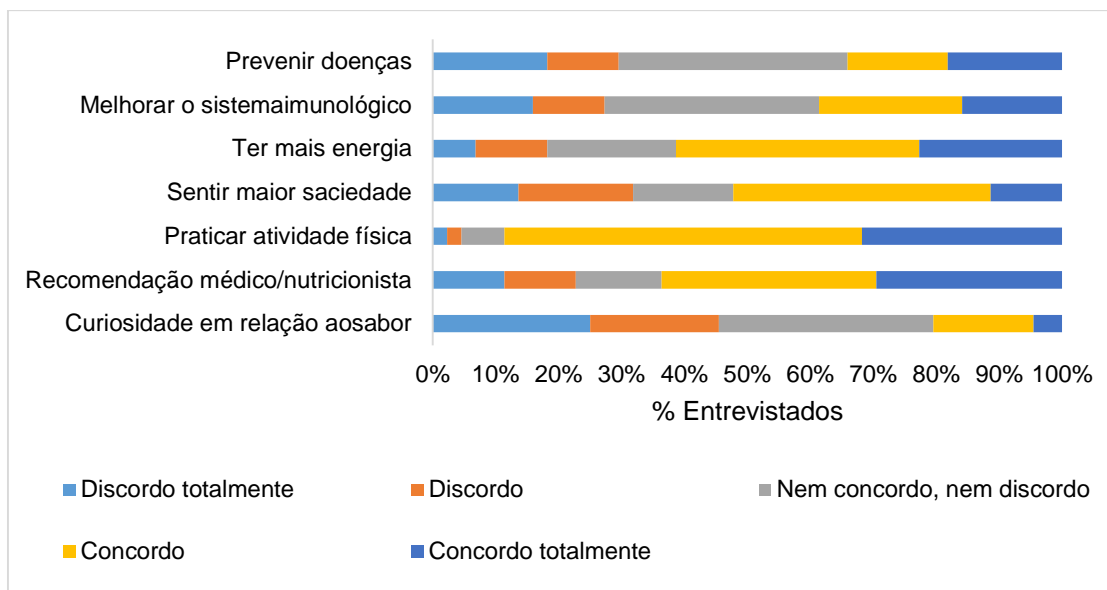


Figura 10. Frequência motivos relacionado ao consumo de whey protein, utilizando escala Likert

5.1.2. Neofobia

A escala FNTS constituída por 13 itens se divide conforme a Tabela 4, sendo seis itens referentes a “novas tecnologias são desnecessárias”, quatro à “percepção de risco”, dois a “escolhas saudáveis” e um item à “informação fornecida pela mídia”. Cada pergunta foi respondida utilizando uma escala de 5 pontos, onde 1 corresponde a discordo totalmente e 5 a concordo totalmente, dessa forma para cada pergunta temos uma média das notas de todos os entrevistados. Os itens com asterisco tiveram as notas revertidas, dessa forma as maiores notas são atribuídas a pessoas com neofobia a novas tecnologias. Segundo (83) é possível fazer simples ajuste na escala de 5 pontos utilizada neste estudo para a escala de 7 pontos equivalente (81), assim a soma das respostas de cada entrevistado pode atingir notas que variam de 13 a 65. Assim, a classificação baixo ou neofílicos (13-30), médio ou neutros (31-50) e alto ou neofóbicos (51- 65) em relação à tecnologia de alimentos, pode ser utilizada.

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.

Descrição	Item	Média notas	Desvio Padrão
Novas tecnologias são desnecessárias	Eu não estou totalmente familiarizado com novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos.	3,45	1,068
	Novos alimentos não são mais saudáveis do que os alimentos tradicionais.	2,99	1,068
	As afirmações sobre os benefícios de novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos são frequentemente muito exageradas.	3,05	0,857
	Já existem inúmeros alimentos saborosos no mercado, então nós não precisamos de novas tecnologias para produzir mais alimentos.	2,13	1,014
	Novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos reduzem a qualidade natural dos alimentos.	2,46	1,084
Percepção de riscos	Não faz sentido experimentar alimentos produzidos a partir de alta tecnologia, porque os que eu consumo já são bons o suficiente.	2,30	1,100
	Novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos provavelmente não trarão, a longo prazo, efeitos negativos à saúde*	2,93	1,015
	Novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos podem causar, a longo prazo, efeitos negativos ao meio ambiente.	2,61	0,971
	Pode ser arriscado mudar rapidamente para novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos.	2,57	0,967
	A sociedade não deve depender demais de tecnologias para resolver os seus problemas alimentares.	2,41	1,195
Escolhas saudáveis	Novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos proporcionam às pessoas um maior controle sobre as suas escolhas alimentares. *	2,69	0,965
	Novos produtos que utilizam novas tecnologias de alimentos podem ajudar as pessoas a terem uma dieta equilibrada. *	2,48	0,963
Informações/mídia	A mídia geralmente fornece uma visão equilibrada e imparcial das novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos. *	3,43	1,071

Escala de 5 pontos, sendo 1 discordo totalmente e 5 concordo totalmente

*Indica itens que a escala é invertida

A média da soma das notas foi de 35,41(±7,06), sendo que 70,98% dos entrevistados tiveram nota entre 31-50, sendo classificados como neutros em relação a tecnologia de alimentos, 27,62% classificados como neofílicos e somente 1,4% classificados como neofóbicos. Assim, é demonstrado que dentre os entrevistados; pessoas acima dos 50 anos que consomem produtos lácteos;

uma pequena parcela tem aversão a novas tecnologias, tornando viável a aplicação em produtos voltado para este público.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE LEITE

5.2.1. Composição química do soro de leite

Na Tabela 5 são apresentados dados da caracterização da amostra de soro de leite liofilizado proveniente da produção de queijo minas padrão utilizado neste experimento.

Tabela 5. Caracterização soro de leite liofilizado

	Matéria seca (%)	Cinzas (%)	Proteína total (%)	Minerais					
				Ca (g/kg)	Mg (g/kg)	P (g/kg)	K (g/kg)	Na (g/kg)	Fe (mg/kg)
Média	96,00	7,48	13,51	6,10	1,61	5,96	25,28	6,30	3,47
Desvio padrão	0,09	0,10	0,04	0,03	0,02	0,13	0,24	0,07	0,74
CV(%)	0,10	1,36	0,31	0,41	1,22	2,19	0,93	1,17	21,36

Ca=cálcio; Mg=magnésio; P=fósforo; K=potássio; Na=sódio; Fe=ferro.
CV= Coeficiente de variação

Segundo a Instrução Normativa 80/2020 (95) o soro de leite em pó deve apresentar mínimo de 10% de proteína, máximo de 5% de umidade e máximo de 9,5% de cinzas, desta forma a amostra atende aos requisitos determinados pela legislação.

González-Weller et al. (96) analisaram suplementos de whey protein e obtiveram média de Ca 3,81 g/kg, Mg 0,81 g/kg, K 4,7 g/kg, Na 3,38 g/kg e Fe 25,74 mg/kg. Guefai et al. (97) ao analisar suplementos de whey protein obtiveram médias de Ca 1,06 g/kg, Mg 0,72, K 4,98 g/kg, Na 3,57 g/kg e Fe 22 mg/kg. Os valores de minerais encontrados na amostram são maiores do que

nos suplementos citados, com exceção do ferro, porém deve ser considerado que a amostra é um soro de leite puro liofilizado, já estes suplementos podem conter outros componentes.

5.2.2. Quantificação de proteína por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As concentrações de α -lactalbumina foram $20,50 \pm 0,82$ mg /g base seca de proteína de soro e de β -lactoglobulina foi de $62,61 \pm 1,95$ mg /g base seca de proteína de soro de leite. Em soro de leite bovino há aproximadamente três vezes mais β -Lg em relação a α -La (12), dessa forma a matéria-prima em estudo contém concentrações de β -Lg e α -La dentro do esperado.

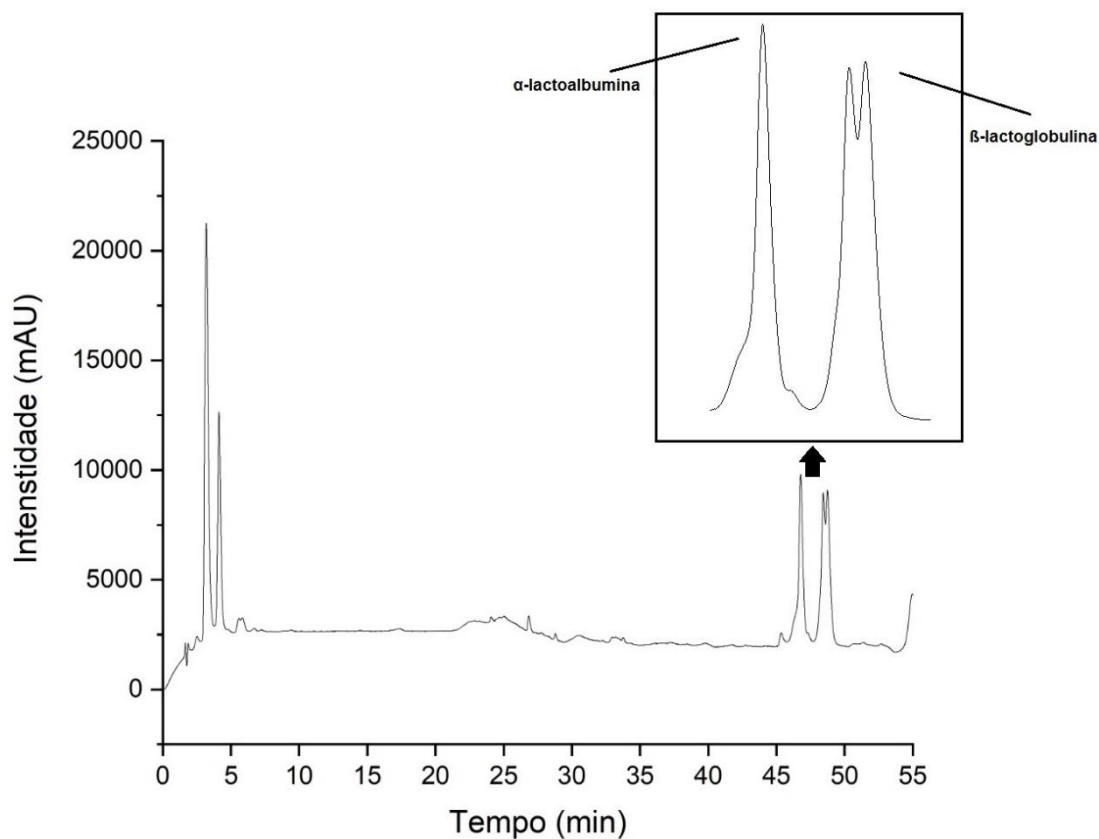


Figura 11. Cromatograma de amostra de proteína de soro de leite liofilizado da produção de queijo minas frescal

5.3. DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO UV-C NO SORO DE LEITE

5.3.1. Quantificação de tióis livres acessíveis

O tratamento com a luz UV-C promove uma transferência de elétrons entre triptofano e tirosina vicinal as pontes dissulfeto, levando à clivagem destas pontes dissulfeto, levando a tióis livres (98). As pontes de dissulfeto são ligações covalentes especialmente importantes na manutenção da estrutura terciária proteica, em processos de agregação via *cross-link* e função de algumas proteínas. Além disso, a luz UV-C promove uma transferência de fotoelétrons entre ligações dissulfetos intracadeias e Trp espacialmente proximal, levando à fotodisrupção da tríade Cys-Cys, Trp estruturalmente conservada. A redução fotoinduzida da ponte dissulfeto originando grupos tióis livres promove alterações estruturais secundárias na proteína, expondo as regiões hidrofóbicas e melhorando o acesso às enzimas proteolíticas. Dessa forma, espera-se que a irradiação UV-C possibilite a exposição das regiões hidrofóbicas das proteínas presentes em soro de leite bovino e aumentar a susceptibilidade à hidrólise pela tripsina, modificando as proteínas e dando ao consumidor um produto mais digerível e seguro (99,100)

Os tióis livres podem ser espectroscopicamente quantificados, pois o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) quando na presença de tióis livres reage estequiometricamente e essa reação forma o produto 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB⁻¹) que se ioniza a TNB⁻² sendo que este composto possui uma cor amarelada.

O efeito da irradiação UV na amostra foi analisado antes e após diferentes tempos de irradiação, utilizando a absorvidade molar do TNB, $\epsilon_{\text{TNB}} = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, sendo feito o cálculo da concentração de tiol livre (Figura 12). Obteve-se uma concentração de 23 μM de grupos sulfidrilas livres para a amostra sem irradiar e após 4 horas de irradiação da amostra essa concentração quase dobrou (42,9 μM).

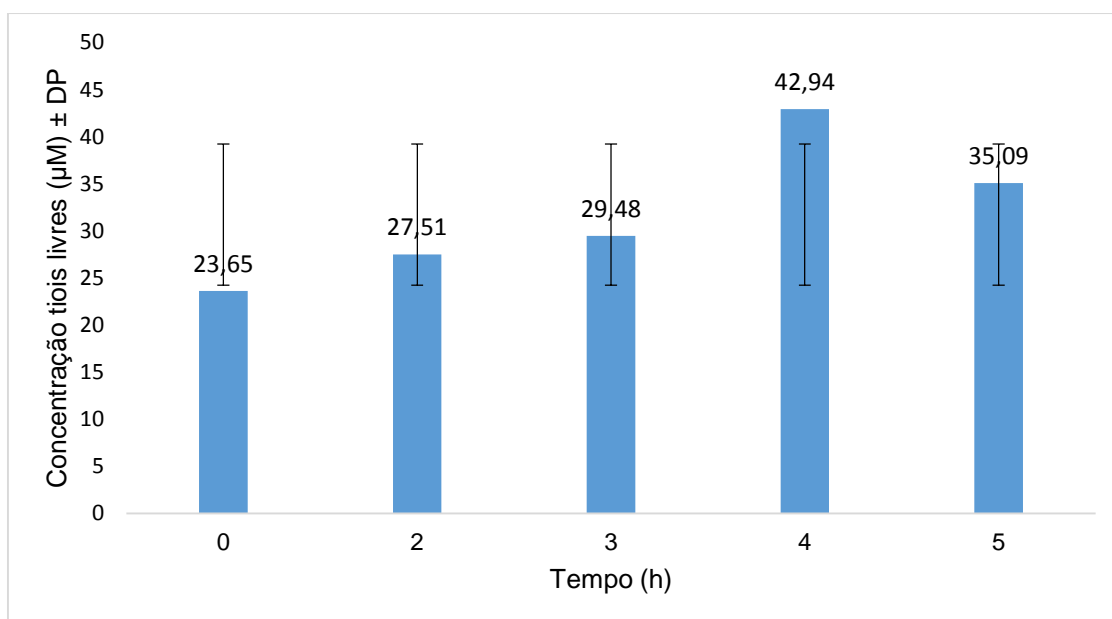


Figura 12. Concentração de tióis livres formados a partir da exposição da β -lactoglobulina a luz UV-C (254 nm)

Após os testes em diferentes tempos foi decidido definir como tempo de irradiação 4 h, pois neste tempo a amostra atingiu uma concentração maior de tióis livres.

A β -lactoglobulina possui duas pontes dissulfeto (Cys160 – Cys66 e Cys106 – Cys119) e uma cisteína livre, enquanto a α -lactoalbumina possui 4 pontes de dissulfeto, sendo: Cys28-Cys111, Cys91- Cys73, C120-C6, Cys77-Cys61 (101,102). SILVA, (2019) irradiou β -lactoglobulina e α -lactoalbumina separadamente por 2 horas em 266 nm, a proteína β -l teve um aumento de cinco

vezes na concentração de tiois livres, enquanto a α -I não apresentou diferença após as 2 horas de irradiação. Dessa forma, é esperado que na proteína do soro de leite a quebra da ponte de dissulfeto ocorra, em sua maioria, na β -lactoglobulina devido à proximidade desta ponte ao Trp61 e que ambas as pontes sejam reduzidas.

Kristo et al., (2012) relataram um aumento de 22% nos tióis livres acessíveis após exposição de solução de 1% de soro de leite isolado à ultravioleta operando no mesmo comprimento de onda deste estudo.

O resultado de CLAE para β -Lg foi de $62,61 \pm 1,95$ mg / base seca de proteína de soro de leite, a concentração de amostra utilizado foi de 66mg/mL, dessa forma temos uma concentração de 4,13 mg de β -Lg / mL. A β -Lg possui peso molecular 18362 Da, então em 4,13 g/L há $2,25E-04$ de moles de beta. O resultado de quantificação de tióis mostrou que no tempo zero (t_0) há $2,36466E-05$ mol/L e após 4 horas (t_4) de irradiação $4,29399E-05$ mol/L de tiol livre. Quando comparamos estes resultados com a quantidade inicial de β -Lg na reação, possivelmente no t_0 houve uma quebra de 10,5% das pontes dissulfeto e no t_4 uma quebra de 19,1%.

5.4. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO SORO DE LEITE PROCESSADO E POR RADIAÇÃO UV-C

5.4.1. Análise da qualidade microbiológica

A eficácia da luz UV-C na inativação de uma ampla gama de microrganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos é amplamente relatada na literatura científica (103,104), portanto, com a finalidade de confirmar estes relatos e a eficiência da metodologia utilizada foi realizada contagem total de

bactérias, *Enterobacteriaceae* e bactérias lácticas comparando a amostra de soro de leite irradiada por luz UV-C (SI), pasteurizada (SP) e sem tratamento - controle (CT).

Tabela 6. Contagem microrganismos no soro de leite com diferentes tratamentos

Tratamento	Microrganismo (Média log ₁₀ UFC mL ⁻¹)		
	Contagem total de bactérias	Enterobactérias	Bactérias lácticas
CT	2,90 ± 0,10	2,28 ± 0,10	0,58 ± 0,27
SP	2,61 ± 0,54	2,16 ± 0,03	0,63 ± 0,13
SI	<1	<1	0,98 ± 0,05

¹CT=controle; SP= soro pasteurizado; SI= soro irradiado

A amostra de soro irradiada não apresentou crescimento para contagem total de bactérias e enterobactérias, confirmando o que foi constatado por Buhler et al. (105) que o tratamento UV pode ser equivalente à pasteurização térmica em termos de estabilização microbiológica e melhor preservação da qualidade do soro. Já a amostra controle e o soro pasteurizado apresentaram crescimento destes microrganismos em torno de 10²UFC/mL para ambas (Tabela 6). Em relação as bactérias lácticas houve uma maior contagem de colônias na amostra irradiada. Peng et al. (106) relataram que as bactérias lácticas possuem diversos mecanismos de proteção contra o estresse UV através da produção de substâncias fotoprotetoras ou adaptando sua resposta à radiação UV, tendo um atraso de crescimento e retomando seu crescimento após a remoção da radiação. Além disso, a aplicação de UV pode induzir mutações de bactérias lácticas e melhorar suas atividades.

Segundo a instrução Normativa 60/2019 (107), que estabelece padrões microbiológicos para alimentos, tanto o leite pasteurizado quanto o soro de leite

em pó não devem ter mais que 10 UFC/(g ou mL) de enterobactérias, dessa forma somente o soro irradiado ficou dentro do padrão estabelecido, mostrando que o processamento tem potencial para ser utilizado em substituição ao processamento térmico, mantendo a segurança microbiológica do produto.

5.5. Análise de bioacessibilidade de minerais por ICP OES

A bioacessibilidade de minerais refere-se à capacidade do nosso organismo em absorver e utilizar esses minerais presentes nos alimentos que consumimos. A bioacessibilidade desses minerais é influenciada por diversos fatores, incluindo a forma química em que os minerais estão presentes no soro de leite, a presença de outros componentes alimentares e a interação com o ambiente gastrointestinal (108). O soro de leite bovino é uma fonte naturalmente rica em minerais essenciais, como cálcio, magnésio, fósforo e potássio, que desempenham papéis vitais no funcionamento adequado do nosso corpo. Estudos têm demonstrado que a bioacessibilidade dos minerais em soro de leite bovino é geralmente alta, o que significa que esses minerais são facilmente absorvidos e utilizados pelo nosso organismo. Isso torna o soro de leite bovino uma excelente opção para suprir as necessidades minerais do nosso corpo de forma eficiente. No entanto, é importante ressaltar que a bioacessibilidade pode variar entre os minerais e também depende da saúde individual, do estado nutricional e de outros fatores específicos de cada pessoa (108,109).

Tabela 7. Concentração total de analitos (mg kg^{-1}) e teor bioacessível (%) da amostra de soro de leite liofilizado

Elemento	Total (mg kg^{-1})	Fração Bioacessível	
		Soro Controle	Soro Irradiado
Ca	4965 ± 261	1118 ± 116 (22,5%)	1987 ± 235 (40%)
Mg	865 ± 35	295 ± 20 (34,1%)	272 ± 15 (31%)
P	4810 ± 246	2020 ± 189 (42,0%)	2527 ± 91 (52%)
S	1655 ± 69	1265 ± 35 (76,4%)	1166 ± 118 (70%)
Fe	2,37 ± 0,12	0,87 ± 0,02 (36,7%)	0,98 ± 0,07 (41%)
Zn	2,94 ± 0,23	0,51 ± 0,03 (17,3%)	0,58 ± 0,06 (20%)
Cu	0,778 ± 0,053	<0,07*	0,143 ± 0,011 (18%)
Mn	0,0414 ± 0,003	<0,03*	<0,03*

Ca=cálcio; Mg=magnésio; P=fósforo; S=enxofre; Fe=ferro; Zn=zinco; Cu=cobre; Mn=manganês
*limite detectável da análise

O soro de leite irradiado de forma geral obteve maior porcentagem de bioacessibilidade de minerais do que o soro controle, com exceção do enxofre e magnésio onde o valor foi menor e do manganês que ambas amostras não tiveram limites detectáveis.

Fioravanti et al. (110) analisaram a bioacessibilidade de minerais em fórmulas infantis e obtiveram as seguintes variações de percentuais para minerais Ca (1,2–10%), Mg (15–35%), P (19–33%), Fe (1,9-34%), Zn (0,8–11%), Cu (19-23%), Mn (0,6–20%) e K (36–40%).

5.6. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SORO DE LEITE IRRADIADO POR UV-C

O soro de leite hidrolisado tem um alto valor agregado, pois fornece benefícios, como por exemplo uma absorção mais fácil e rápida (63).

5.6.1. Grau de hidrólise

A média do grau de hidrólise do soro controle (4,96%) diferiu do soro irradiado (SI) (5,97%) ($p < 0,05$), sendo que o soro irradiado apresentou valores

estatisticamente maiores em todos os tempos em relação ao controle. Na amostra irradiada, o tempo 150 min (7,64%) não diferiu ($p>0,05$) dos tempos 120 (6,59%) e 180 (8,59%) min, porém estes foram diferentes entre si ($p<0,05$).

O grau máximo teórico de hidrólise para tripsinólise de β -Lg é 10,6% (111), porém normalmente nos experimentos este valor não é atingido. Cavalcante et al. (79) analisaram o grau de hidrólise de proteína isolada do soro de leite utilizando tripsina e concluíram que a irradiação aumentou o grau de hidrólise em 2% em relação a proteína controle (7,2%). Cheison et al. (111) analisaram o grau de hidrólise de β -lactoglobulina bovina purificada também utilizando tripsina e encontraram valores máximo 9,5% considerando uma hidrólise de 26h. Considerando os dados da literatura e deste trabalho podemos inferir que o tratamento com UV-C pode melhorar a hidrólise da proteína, chegando a resultados próximos com menos tempo de hidrólise.

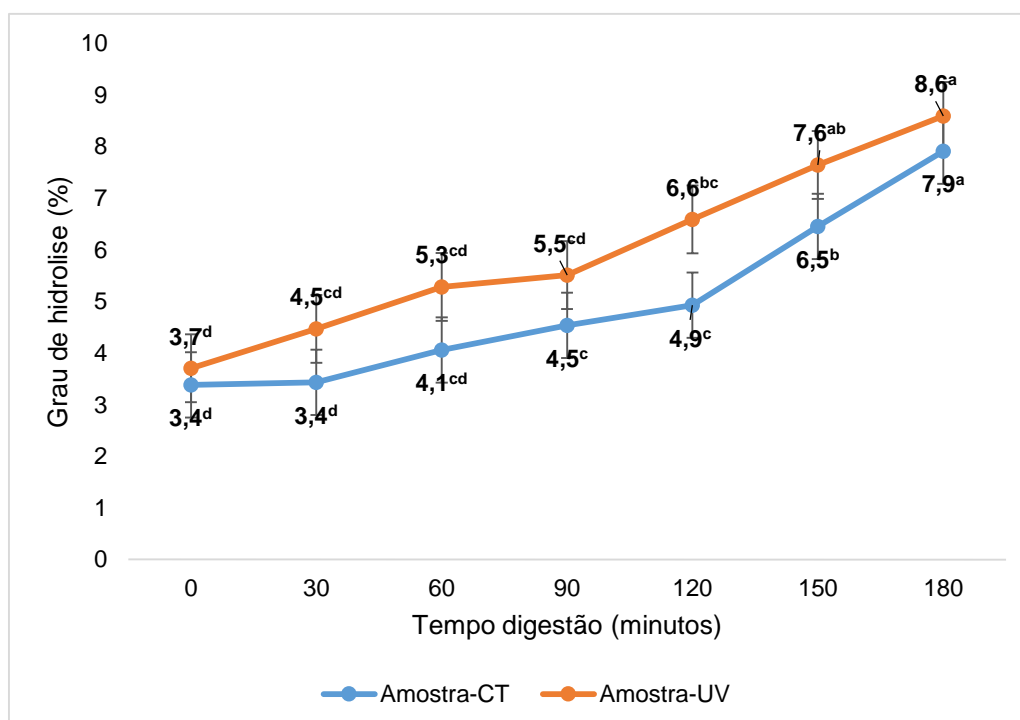


Figura 13. Grau de hidrólise do soro de leite controle e irradiado pelo período de 3 horas de hidrólise triptica sob condições de E/S 1:20(m/m)

CT=controle; SI= soro irradiado

^{a,b,c} letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa do tempo pelo teste de Newman-Keuls (SNK) ($p < 0,05$)

5.6.2. Análise de peptídeos por MALDI-TOF

Após a hidrólise enzimática por tripsina foram obtidos diferentes peptídeos tanto na amostra controle como na amostra irradiada por UV-C na faixa de trabalho avaliada (de 500 a 3500 m/z). Um total de 29 peptídeos foram obtidos da β -lactoglobulina e 16 foram obtidos da α -lactoalbumina como demonstrado na Figura 14.

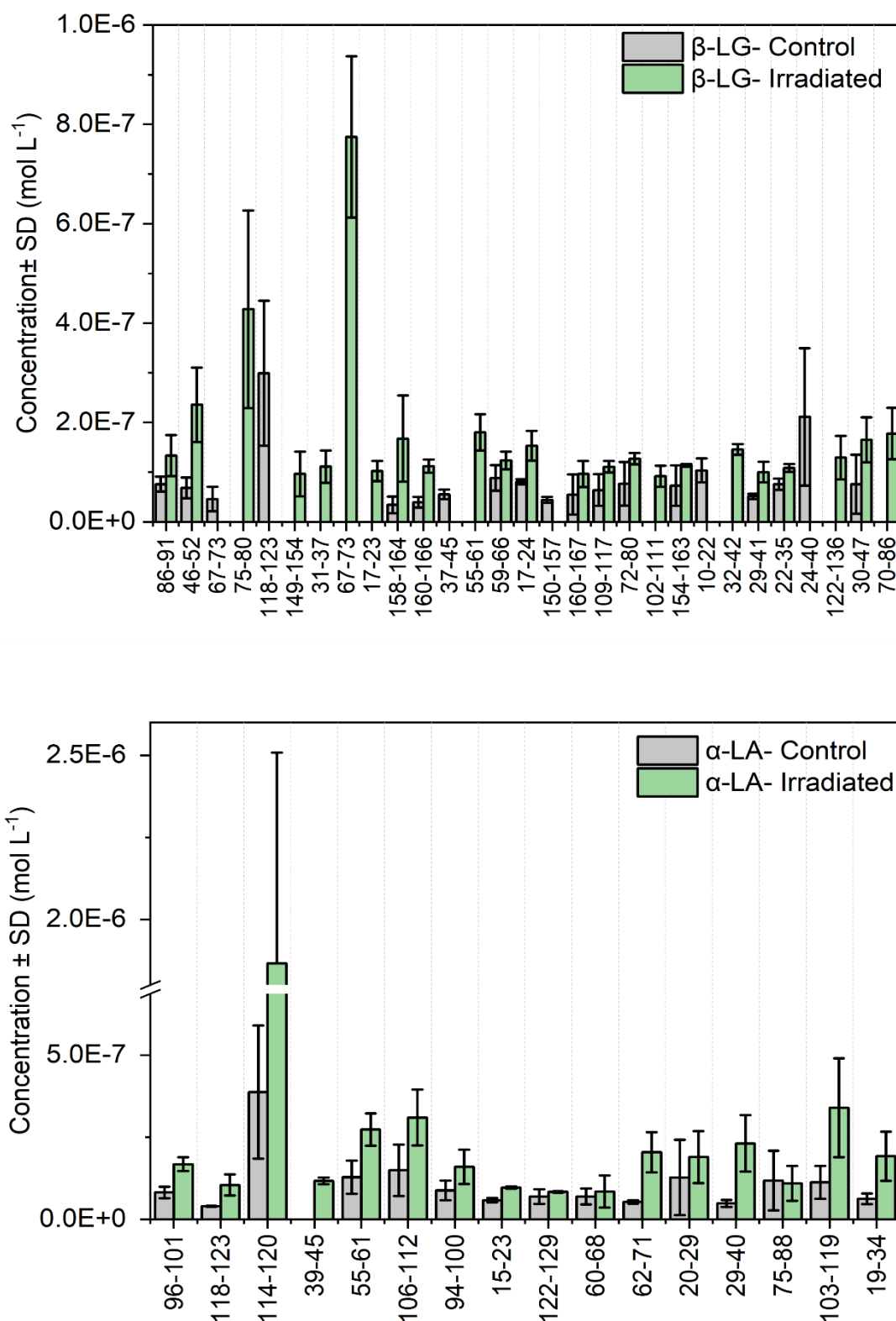


Figura 14. Concentração de peptídeos identificados no soro de leite hidrolisado. As digestões prosseguiram com tripsina 1:20 E/S. A figura A foi obtida a partir de β -lactoglobulina e a figuras B de α -lactoalbumina.

Dentre os peptídeos identificados na amostra foram encontrados quatro peptídeos bioativos, sendo dois obtidos a partir de β -lactoglobulina ($f_{158-164}$, f_{17-24}) e dois a partir de α -lactoalbumina (f_{39-45} , f_{20-29}). A concentração destes peptídeos ao longo das 3 horas de hidrólise está demonstrada na Figura 15.

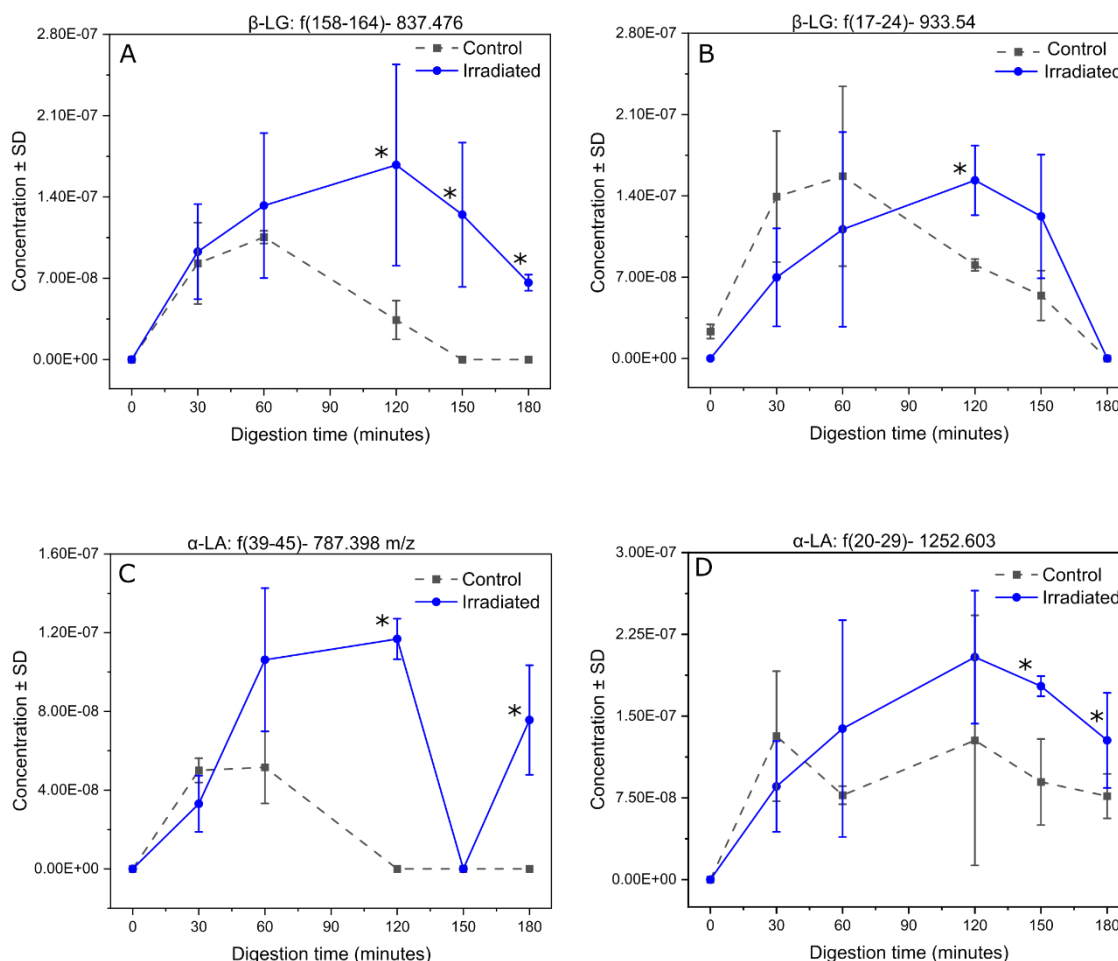


Figura 15. Concentração de peptídeos bioativos ao longo do tempo no soro de leite. As digestões prosseguiram com tripsina 1:20 E/S. As figuras A e B foram obtidas a partir de β -lactoglobulina. Figuras C e D de α -lactoalbumina. A linha azul é referente a peptídeos

*Diferença significativa entre controle e tratamento.

O fragmento tríptico de sequência $f_{(158-164)}$ (ALPMHIR), é reportado por ter atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA), a inibição dessa enzima pode exercer um efeito anti-hipertensivo (112). A hidrólise com

tripsina geralmente resulta em hidrolisados com boa atividade inibidora da ECA (59) e os resultados mostraram que o tratamento com UV-C aumentaram a concentração deste peptídeo, tendo seu maior valor após 120 minutos de hidrólise e diferindo estatisticamente da amostra controle neste tempo.

O fragmento tríptico de sequência f(17-24) LIVTQTMK encontra-se no banco de dados sugerido por Nielsen (63) e foi reportado por Jacquot et al. (113) por possuir características estruturais que poderiam inibir o dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV), sugerindo que também poderiam ter uma atividade inibitória (114).

A identificação de peptídeos bioativos conectados por meio de ligações dissulfeto ressalta a importância contínua de preservar a integridade estrutural da α -La durante o processo de purificação, através de condições de processamento suaves. Sabe-se que o tratamento térmico pode modificar o perfil de ligações dissulfeto nas proteínas e promover reticulações intermoleculares. Foi comprovado que a α -La, seja isolada ou em coexistência com outras proteínas do soro do leite, promove a formação de ligações dissulfeto intermoleculares, especialmente envolvendo a Cys 61. Essas ligações intermoleculares, por sua vez, atuam como barreiras que impedem a liberação dos peptídeos bioativos dissulfeto. (115).

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, Marette 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.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “ESTUDO DE ATITUDE DE CONSUMIDOR E ANÁLISE SENSORIAL DE PRODUTOS LÁCTEOS OBTIDOS POR TECNOLOGIAS NÃO CONVENCIONAIS”

O objetivo deste estudo é analisar hábitos de consumo e investigar a atitude de consumidores de produtos lácteos, diante de tecnologias não convencionais para processamento de alimentos. Esta pesquisa é coordenada pela Embrapa Pecuária Sudeste no Brasil.

Você foi selecionado e sua participação não é obrigatória.

Você pode recusar ou desistir em responder o questionário a qualquer momento, sendo que não sofrerá nenhum dano, bem como não terá nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em responder um questionário socioeconômico e questões relacionadas à hábitos de consumo e percepção de novas tecnologias de alimentos e atitude na compra de produtos lácteos.

Esta pesquisa não envolve nenhuma ingestão de produto.

- Caso sinta-se cansado ou desconfortável em responder o questionário você pode encerrar, a qualquer momento, sem prejuízos;
- As informações fornecidas na pesquisa serão utilizadas única e exclusivamente para fins de pesquisa e a identidade e qualquer dado pessoal dos respondentes será mantida em sigilo.
- Caso tenha qualquer dúvida estaremos a postos para esclarecimentos.

Quanto aos benefícios, informamos que os dados obtidos serão utilizados para fornecer informações que contribuam para a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos lácteos. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

Não haverá ressarcimento de despesas pelo seu tempo para responder a este questionário.

Você receberá uma via deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Pesquisadora Responsável: Renata Tieko Nassu, R.G. 15.158.217 Embrapa Pecuária Sudeste. Rodovia Washington Luiz, km 234 – Fazenda Canchim, C.P. 339 – São Carlos – SP. Telefone: 16-3411-5681

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Centro Universitário Central Paulista - UNICEP que funciona no Centro Universitário Central Paulista - UNICEP, localizado na rua Miguel Petroni, 5111, São Carlos - SP – Brasil. Fone (16) 3362-2111. Endereço eletrônico: comitedeetica@unicep.com.br

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Pesquisadora Responsável

Participante

ANEXO II

08/11/2021 08:28

Questionário atitude do consumidor em relação a produtos lácteos

Questionário atitude do consumidor em relação a produtos lácteos

Prezado(a), você está sendo convidado a responder um questionário que faz parte do projeto de pesquisa "ESTUDO DE ATITUDE DE CONSUMIDOR E ANÁLISE SENSORIAL DE PRODUTOS LÁCTEOS OBTIDOS POR TECNOLOGIAS NÃO CONVENCIONAIS".

Este questionário é voltado para pessoas acima de 50 anos e pessoas que convivem com idosos (+60) e tem o objetivo de analisar hábitos de consumo e investigar a atitude de consumidores de produtos lácteos, diante de tecnologias não convencionais para processamento de alimentos.

Para maiores informações, leia o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no link <https://drive.google.com/file/d/1xuMgmYPUtTaIJ6QLLWFqSg53Xv6o8QFI/view?usp=sharing>.

Sua participação é essencial para o desenvolvimento do nosso projeto. Ela se dará por meio do preenchimento deste questionário e o tempo previsto para o preenchimento é de aproximadamente 15 minutos.

Desde já, agradecemos a disponibilidade e colaboração com esta pesquisa.

Qualquer dúvida entre em contato no e-mail: cecilia.cordeiro@unesp.br

***Obrigatório**

1. Você aceita participar desta pesquisa de opinião? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim *Pular para a pergunta 2*
- Não

Dados sócio demográficos

2. Qual o seu gênero? *

Marcar apenas uma oval.

- Feminino
- Masculino
- Outro: _____

3. Qual o seu estado civil? *

Marcar apenas uma oval.

- Solteiro(a)
- Casado(a)
- Separado(a)
- Viúvo(a)
- Outro: _____

4. Qual seu grau de escolaridade? *

Marcar apenas uma oval.

- Ensino fundamental incompleto
- Ensino fundamental completo
- Ensino médio incompleto
- Ensino médio completo
- Ensino superior incompleto
- Ensino superior completo
- Especialização
- Mestrado
- Doutorado
- Pós doutorado

5. Em qual estado você reside? *

Marcar apenas uma oval.

- Acre (AC)
- Alagoas (AL)
- Amapá (AP)
- Amazonas (AM)
- Bahia (BA)
- Ceará (CE)
- Distrito Federal (DF)
- Espírito Santo (ES)
- Goiás (GO)
- Maranhão (MA)
- Mato Grosso (MT)
- Mato Grosso do Sul (MS)
- Minas Gerais (MG)
- Pará (PA)
- Paraíba (PB)
- Paraná (PR)
- Pernambuco (PE)
- Piauí (PI)
- Rio de Janeiro (RJ)
- Rio Grande do Norte (RN)
- Rio Grande do Sul (RS)
- Rondônia (RO)
- Roraima (RR)
- Santa Catarina (SC)
- São Paulo (SP)
- Sergipe (SE)
- Tocantins (TO)

6. Qual a sua faixa de renda? Salário mínimo: R\$1100,00 *

Marcar apenas uma oval.

- Menos de 2 salários mínimos
- Acima 2 a 3 salários mínimos
- Acima 3 a 5 salários mínimos
- Acima 5 a 10 salários mínimos
- Acima 10 a 20 salários mínimos
- Acima 20 salários mínimos

7. Qual a sua idade? *

Marcar apenas uma oval.

- Menos de 20 anos *Pular para a pergunta 10*
- 20 a 30 anos *Pular para a pergunta 10*
- mais de 30 anos até 40 anos *Pular para a pergunta 10*
- mais de 40 anos até 50 anos *Pular para a pergunta 10*
- mais de 50 anos até 60 anos
- acima de 60 anos

Informações pessoais

8. Você já está aposentado(a)? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

9. Quem faz a maioria das compras na sua residência? *

Marcar apenas uma oval.

- Eu mesmo
- Cônjuge
- Filho(s)
- Outro: _____

Pular para a pergunta 14

Relação com o idoso

10. Qual o seu vínculo com o idoso (acima de 60 anos)? *

Marcar apenas uma oval.

- Filho(a)
- Neto(a)
- Sobrinho(a)
- Cuidador(a)
- Irmão(a)
- Não possuo vínculo
- Outro: _____

11. Você realiza as compras para o idoso? *

Marcar apenas uma oval.

- Sempre
- Na maioria das vezes
- Algumas vezes
- Nunca

08/11/2021 08:28

Questionário atitude do consumidor em relação a produtos lácteos

12. Você conhece as preferências de compras do idoso? *

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

13. Você estaria disposto a responder as próximas questões com base na opinião do idoso que você convive? *

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

Em relação a produtos alimentícios

SE ESTIVER RESPONDENDO PELO CELULAR VIRE A TELA NA HORIZONTAL

08/11/2021 08:28

Questionário atitude do consumidor em relação a produtos lácteos

14. Em um produto alimentício é importante: (marque o quanto você concorda com as afirmações) *

Marcar apenas uma oval por linha.

	Discordo totalmente	Discordo	Nem concordo, nem discordo	Concordo	Concordo totalmente
Preço adequado em relação a qualidade do produto	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sabor, odor e aparência agradável	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Qualidade higiênico-sanitária	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Facilidade de consumo/preparo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Saudabilidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Embalagem fácil de abrir	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Ter inovação na tecnologia aplicada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

08/11/2021 08:28

Questionário atitude do consumidor em relação a produtos lácteos

15. Em relação a tecnologia aplicada na fabricação de produtos alimentícios:
(marque o quanto você concorda com as afirmações) *

Marcar apenas uma oval por linha.

	Discordo totalmente	Discordo	Nem concordo, nem discordo	Concordo	Concordo totalmente
Eu presto atenção nas informações na embalagem do produto	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
As informações de tecnologia aplicada afeta minha decisão de compra	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Eu pagaria mais por um produto com inovação na tecnologia aplicada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Em relação a produtos lácteos

SE ESTIVER RESPONDENDO PELO CELULAR VIRE A TELA NA HORIZONTAL

16. Você consome produtos lácteos (iogurte, bebida láctea, queijo, requeijão) *

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

17. Quão importante você considera a inclusão de produtos lácteos na dieta? *

Marcar apenas uma oval.

- Nada importante
- Pouco importante
- Razoavelmente importante
- Muito importante
- Extremamente importante

08/11/2021 08:28

Questionário atitude do consumidor em relação a produtos lácteos

18. Eu consumo produtos lácteos porque: (marque o quanto você concorda com as afirmações) *

Marcar apenas uma oval por linha.

	Discordo totalmente	Discordo	Nem concordo, nem discordo	Concordo	Concordo totalmente
É familiar para mim	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Eu gosto	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
É saudável	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
É parte essencial de uma refeição	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Devido ao conteúdo de proteína	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
É fácil de preparar	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
É barato	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Faz me sentir bem	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pode ser comprado em locais perto de onde moro	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Está sempre disponível em supermercados	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Tem bom custo/benefício	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Faz me sentir satisfeito e me dá energia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Conheço a marca/procedência	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Recomendação médica/nutricionista	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

19. Qual sua frequência de consumo desses diferentes tipos de produtos lácteos *

Marcar apenas uma oval por linha.

	Nunca	Menos de uma vez por mês	1-3 vezes por mês	Uma vez por semana	2 - 3 vezes por semana	4 - 6 vezes por semana	Uma vez por dia ou mais
Leite fluido	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Leite em pó	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
logurte	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Bebida láctea	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Queijo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Requeijão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Petit suisse (tipo Danoninho®)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sobremesa láctea (tipo Danette®)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Whey protein (proteína do soro de leite)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Em relação a whey protein

20. Você já ouviu falar/conhece whey protein (proteína do soro de leite)? *

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

08/11/2021 08:28

Questionário atitude do consumidor em relação a produtos lácteos

21. Você consome whey protein? *

Marcar apenas uma oval. Sim Não *Pular para a pergunta 23*

Em relação ao consumo de whey protein

SE ESTIVER RESPONDENDO PELO CELULAR VIRE A TELA NA HORIZONTAL

22. Com qual intuito consumiu whey protein? (marque o quanto você concorda com as alternativas) *

Marcar apenas uma oval por linha.

	Discordo totalmente	Discordo	Nem concordo, nem discordo	Concordo	Concordo totalmente
Curiosidade em relação ao sabor	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Recomendação médico/nutricionista	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Praticar atividade física	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sentir maior saciedade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Ter mais energia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Melhorar o sistema imunológico	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Prevenir doenças	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Em relação a novas tecnologias

SE ESTIVER RESPONDENDO PELO CELULAR VIRE A TELA NA HORIZONTAL

08/11/2021 08:28

Questionário atitude do consumidor em relação a produtos lácteos

23. Por favor, indique o quanto você concorda ou discorda com as seguintes afirmações *

Marcar apenas uma oval por linha.

	Discordo totalmente	Discordo	Nem concordo, nem discordo	Concordo	Concordo totalmente
Eu não estou totalmente familiarizado com novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Novos alimentos não são mais saudáveis do que os alimentos tradicionais	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
As afirmações sobre os benefícios de novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos são frequentemente muito exageradas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Já existem inúmeros alimentos saborosos no mercado então nós não precisamos de novas tecnologias para produzir alimentos.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos reduzem a qualidade natural dos alimentos.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

https://docs.google.com/forms/d/1oICxJcHgrjVg7n_n7uelvZdD4n0Fyp6iXaoXMvKpYR4/edit

13/15

08/11/2021 08:28

Questionário atitude do consumidor em relação a produtos lácteos

Novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos provavelmente não trarão, a longo prazo, efeito negativo à saúde.

Novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos proporcionam às pessoas um maior controle sobre as suas escolhas alimentares.

Novos produtos que utilizam novas tecnologias de alimentos podem ajudar as pessoas a terem uma dieta equilibrada.

Novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos podem causar, a longo prazo, efeitos negativos ao meio ambiente

Pode ser arriscado mudar rapidamente para novas tecnologias empregadas na produção e/ou processamento de alimentos.

A sociedade não deve depender de tecnologias para resolver os seus

08/11/2021 08:28

Questionário atitude do consumidor em relação a produtos lácteos

problemas
alimentares.

Não faz sentido
experimentar
alimentos
produzidos a partir
de alta tecnologia,
porque os que eu
consumo já são bons
e suficientes.

A mídia geralmente
fornece uma visão
equilibrada e
imparcial das novas
tecnologias
empregadas na
produção e/ou
processamento de
alimentos.

Este conteúdo não foi criado nem aprovado pelo Google.

Google Formulários