

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

AVALIAÇÃO DO PROCESSAMENTO DE LEITE BOVINO NA
DIGESTIBILIDADE E ALERGENICIDADE DAS PROTEÍNAS LÁCTEAS

IVA PAULA FREITAS DOS SANTOS

2021



UFRRJ

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSAMENTO DE LEITE BOVINO NA
DIGESTIBILIDADE E ALERGENICIDADE DAS PROTEÍNAS LÁCTEAS**

IVA PAULA FREITAS DOS SANTOS

Sob orientação da Professora
Caroline Mellinger Silva

E coorientação da Professora
Lourdes Maria Correa Cabral

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Ciência e Tecnologia de Alimentos no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na área de concentração Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Junho de 2021

S237a Santos, Iva Paula Freitas dos, 1996-
Avaliação do processamento de leite bovino na
digestibilidade e alergenicidade das proteínas lácteas
/ Iva Paula Freitas dos Santos. - Rio de Janeiro,
2021.
73 f.: il.

Orientadora: Caroline Mellinger Silva.
Coorientadora: Lourdes Maria Correa Cabral.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2021.

1. alergia à proteína do leite de vaca. 2.
processamentos de leite. 3. digestibilidade. I.
Silva, Caroline Mellinger, 1976-, orient. II. Cabral,
Lourdes Maria Correa, -, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. IV.
Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



TERMO Nº 783/2021 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.051330/2021-29

Seropédica-RJ, 18 de julho de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

IVA PAULA FREITAS DOS SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/06/2021

Dra. CAROLINE MELLINGER DA SILVA, EMBRAPA
(orientadora)

Dra. JULIA HAUCK TIBURSKI, UFRRJ

Dra. ANA CAROLINA SAMPAIO DORIA CHAVES, EMBRAPA

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020.

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 24/07/2021 12:26)

JULIA HAUCK TIBURSKI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DTA (12.28.01.00.00.00.46)
Matricula: 2230482

(Assinado digitalmente em 28/07/2021 15:57)

ANA CAROLINA SAMPAIO DORIA CHAVES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 136.457.428-40

(Assinado digitalmente em 18/09/2021 10:15)

CAROLINE MELLINGER SILVA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 026.909.329-03

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 783, ano: 2021, tipo: TERMO, data de emissão: 18/07/2021 e o código de verificação: db285b9568

Dedico esse trabalho aos meus avós maternos,
Trajano e Dolores (*in memoriam*), e paternos,
Manoel e Juvelina, por possibilitarem que seus
ensinamentos atravessassem gerações e por todo
carinho, incentivo e orgulho de sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder calma em meio às tempestades, oportunidades durante esse período do mestrado e a paz que excede todo entendimento. Se eu cheguei até aqui é porque Ele sempre esteve ao meu lado.

Aos meus pais, Elias e Erinete, que sempre me apoiaram independente das limitações, me suportaram nos momentos de estresse e se alegraram com cada pequena conquista. Essa conquista pertence a vocês também, pois foi lhes observando que aprendi o significado de superação.

Ao meu namorado, Rodrigo Paixão, por estar sempre presente, me ajudando como pode, seja me acalmando em crises existenciais, me auxiliando a digitar o projeto de qualificação quando estava operada, orando e torcendo por mim. Obrigada por tanto!

A meus familiares e amigos por sempre torcerem pelo meu sucesso e felicidade, compreenderem minha ausência em muitos momentos e ajudarem a tornar a vida mais leve, sempre com muitas risadas e comida.

Às minhas orientadoras Dras. Caroline Mellinger e Lourdes Cabral, que além de profissionais de sucesso são humildes e verdadeiramente humanas; a ciência precisa de mais profissionais assim! Agradeço também por toda confiança, paciência e ensinamentos a mim direcionados.

Aos funcionários e estagiários dos laboratórios de Bioquímica e Bioacessibilidade, Alessandro, Ana Paula Landim, Ana Paula Ribeiro, Fabíola, Flávia, Jeane, Luísa e Tatiana, por tantos ensinamentos, conversas jogadas fora, desabafos e ajuda de variadas formas nos experimentos.

Aos meus colegas da turma de Mestrado 2018.1 pelo carinho e companheirismo especialmente no período das disciplinas. Desejo sucesso e paz na caminhada de todos nós!

Aos colaboradores da Embrapa Agroindústria de Alimentos pelo acolhimento, por gentilmente disponibilizarem equipamentos ou espaço para os experimentos e por tornarem a rotina mais divertida com as conversas e companhias de almoço, cada sorriso e conversa nos corredores. Sentirei falta de vocês!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRRJ, e seus colaboradores pelo acolhimento e dedicação para com seus alunos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pela oportunidade de estágio e utilização dos recursos para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

SANTOS, Iva Paula Freitas dos. **Avaliação do processamento de leite bovino na digestibilidade e alergenicidade das proteínas lácteas**. 2021. 72p Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

O leite é considerado um alimento proteico de alto valor nutricional, uma vez que as proteínas desse alimento apresentam alto valor biológico. Diferentes processamentos empregados no leite geram alterações na sua conformação, impactando a digestão gastrointestinal do alimento e podendo levar a uma alteração nas respostas de alergenicidade por modificar a exposição dos epítomos proteicos. Dessa forma, esse estudo analisou leites comercialmente disponíveis, processados por diferentes tecnologias, comparando a digestibilidade e alergenicidade de leites integrais pasteurizados, tratados por ultra-alta temperatura (UHT), em pó e leite cru. As amostras foram submetidas à simulação do processo de digestão humana *in vitro* e posteriormente avaliadas nos estágios não digeridos e digeridos após as fases gástrica e intestinal por técnicas de eletroforese e quantificação proteica, além de imunoensaio enzimático específico para caseínas e β -lactoglobulina (β -Lg). A digestibilidade entre os leites diferentemente processados foi afetada apenas na fase gástrica, na qual observou-se resistência da β -Lg à ação da pepsina, nos leites pasteurizados, cru e em pó, no entanto, ainda assim, todos os tipos de leite apresentaram redução do teor proteico acima de 90%. Adicionalmente, foi demonstrada uma tendência de redução de alergenicidade nos leites tratados por UHT (~52 %) após digestão simulada no estômago e grande similaridade de potencial alergênico para todos os leites quando não digeridos ou após digestão intestinal, com redução da alergenicidade superior a 96 % em todos os tipos de leite avaliados. Os dados obtidos nesse estudo mostram que os leites analisados apresentaram grande similaridade no que diz respeito à digestibilidade e alergenicidade proteica.

Palavras-chave: Alergia à proteína do leite de vaca, processamentos de leite, digestibilidade.

ABSTRACT

SANTOS, Iva Paula Freitas dos. **Evaluation of bovine milk processing on the digestibility and allergenicity of milk proteins.** 2021. 72p Dissertation (Master in Food Science and Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Milk is considered a protein food of high nutritional value, since its proteins are of high biological value. Different processes used in milk processing may generate changes in its conformation, impacting the gastrointestinal digestion of the food and can lead to a change in allergic responses by modifying the exposure of protein epitopes. Thus, this study analyzed commercially available milk, processed by different technologies, comparing the digestibility and allergenicity of pasteurized whole milk, treated by ultra-high temperature (UHT), in powder and raw milk. The samples were subjected to simulation of the *in vitro* human digestion process, considering the undigested and digested stages after the gastric and intestinal phases by electrophoresis and protein quantification techniques, in addition to specific enzyme immunoassay for caseins and β -lactoglobulin (β -Lg). Digestibility among differently processed milks was affected only in the gastric phase, in which β -Lg resistance to pepsin was observed, in pasteurized, raw and powdered milks, however, all tested processed milks presented a reduction of protein content over 90 %. Additionally, a tendency to reduce allergenicity was demonstrated in UHT-treated milks (~52 %) after simulated digestion in the stomach and great similarity of allergenic potential for all milks when undigested or after intestinal digestion, with a 96% allergenicity reduction in all samples. The data obtained in this study showed that the milk processing, as far as the tested ones, showed a great similarity with regard to digestibility and protein allergenicity.

Key words: Cow's milk protein allergy, milk processing, digestibility.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

α -La	α -lactoalbumina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APLV	alergia  proteína do leite de vaca
ASBAI	Associao Brasileira de Alergia e Imunologia
β -Lg	β -lactoglobulina
BSA	albumina do soro bovino
CN	caseína
ELISA	ensaio de imunoabsoro enzimática
GMP	glicomacropéptido
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Ig	imunoglobulina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
RIISPOA	Regulamento de Inspeo Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
UHT	ultra-alta temperatura

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produo de leite em países selecionados e no mundo de 2016 a 2020 (dados de 2020 são ainda previsão).....	4
Tabela 2. Balança comercial de lácteos, produo total, produo inspecionada e percentual de leite importado pelo brasil entre 2010 e 2020 (valores em bilhões de litros ou equivalente litros).....	5
Tabela 3. Alguns requisitos exigidos pelo MAPA para alcance da qualidade do leite cru refrigerado.	7
Tabela 4. Média dos principais componentes encontrados no leite de vaca.	8
Tabela 5. Média dos principais componentes químicos do leite de diversas raças de bovinos.....	8
Tabela 6. Principais proteínas encontradas no leite.....	15
Tabela 7. Composio química (g/100g) das amostras de leite usadas no estudo.	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura 1. Dinâmica da balança comercial de lácteos do brasil entre 2010 e 2020 (valores em bilhões de litros equivalentes de leite fluido).....	6
Figura 2. Cadeia produtiva do leite.	9
Figura 3. Fluxograma das operaes associadas ao beneficiamento do leite.....	10
Figura 4. Foto de um pasteurizador de placas.....	11
Figura 5. Equipamento para tratamento de UHT.	12
Figura 6. Esquema demonstrando o funcionamento do homogeneizador.....	13

Figura 7. Atomizador para secagem de leite (A); Equipamento industrial (B); Componentes do equipamento (C).....	14
Figura 8. Estrutura das micelas e submicelas de caseína.	17
Figura 9. Estrutura terciária da β -lactoglobulina.	19
Figura 10. Estrutura terciária da α -lactoalbumina.....	20
Figura 11. Mecanismos dos tipos de hipersensibilidade.	21
Figura 12. Reações de hipersensibilidade imediatas e tardias após ingestão de leite de vaca em indivíduos com APLV.	22
Figura 13. Esquema apresentando modificações estruturais e alterações de epítomos das principais proteínas do soro do leite durante tratamento térmico e o impacto na alergenicidade.....	26
Figura 14. Fluxograma da metodologia do estudo.	28
Figura 15. Quantificação de proteínas solúveis pelo método de Bradford (A) e de aminoácidos aromáticos (B) dos leites UHT, pasteurizado, em pó e cru nos estados não digerido (0h), digerido na fase gástrica (2h) e digerido na fase entérica (4h).	34
Figura 16. Eletroforese SDS-PAGE dos leites UHT, pasteurizado, em pó e cru durante a digestão...	35
Figura 17. Eletroforese nativa dos leites UHT, pasteurizado, em pó e cru durante a digestão.	37
Figura 18. Alergenicidade in vitro à caseína e β -Lg nos leites UHT, pasteurizado, em pó e cru nos estágios não digeridos (0h), digeridos no estômago (2h) e digeridos no intestino delgado (4h).	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	JUSTIFICATIVA	2
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1	LEITE BOVINO	3
3.2	MERCADO NO BRASIL E NO MUNDO	3
3.2.1	Definição e classificação	6
3.2.2	Características e composição	7
3.3	ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO DE LEITE	9
3.4	PROCESSAMENTOS DE LEITE BOVINO	10
3.4.1	Pasteurização	10
3.4.2	Ultra alta temperatura (UHT)	11
3.4.3	Homogeneização	12
3.4.4	Desidratação	13
3.1	PROTEÍNAS LÁCTEAS	14
3.1.1	Caseínas	16
3.1.2	Proteínas do soro de leite	18
3.2	ALERGIA À PROTEÍNA DO LEITE DE VACA	20
3.2.1	Epidemiologia	22
3.2.2	Diagnóstico, tratamento e prevenção	23
3.3	DIGESTIBILIDADE DAS PROTEÍNAS LÁCTEAS	23
3.4	RELAÇÃO DE PROCESSAMENTOS COM A ALERGIA E DIGESTIBILIDADE	24
4	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GERAL	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5	METODOLOGIA	27
5.1	MATERIAL	27
5.2	MÉTODOS	28
5.2.1	Determinação de proteínas e gorduras dos leites crus	29
5.2.2	Simulação do processo de digestão	29
5.2.3	Monitoramento da digestão in vitro	29
5.2.4	Eletroforese unidimensional de proteínas	30
5.2.5	Alergenicidade in vitro das proteínas do leite por ELISA	31
5.2.6	Análise estatística	31
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6.1	TEOR DE PROTEÍNAS E GORDURAS DOS LEITES ESTUDADOS	31

6.2	DIGESTÃO PROTEICA	32
6.3	PERFIL PROTEICO POR ELETROFORESE DESNATURANTE E NATIVA	34
6.4	ALERGENICIDADE IN VITRO	38
7	CONCLUSÕES.....	40
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
	ANEXOS	49

1 INTRODUÇÃO

O leite é “uma secreção fluida das fêmeas de todas as espécies de mamíferos” e apresenta como principais funções a nutrição do neonato e o fornecimento de imunoglobulinas, enzimas, fatores de crescimento a agentes antibacterianos. O leite produzido para fins comerciais e consumo humano é definido como “produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas” (ANTUNES, 2003; BRASIL, 2017).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2018), o leite fluido pode ser cru ou tratado termicamente e também pode passar pelo processo de desnate, para remoção total ou parcial do conteúdo lipídico do leite e serão, então, classificados como “integral, “semi-desnatado” e “desnatado”, conforme a quantidade de gorduras que permanecem no leite após o desnate. Caso os leites sejam submetidos ao processo de homogeneização, ou seja, processamento para uniformizar as fases aquosa e gordurosa do leite, isso deve constar no rótulo do produto comercial (ORDÓÑEZ, 2005; BRASIL, 2017). Os leites podem ainda ser tratados por ultra alta temperatura (UHT), que leva à esterilização comercial do leite, sendo conhecidos, portanto, como leite longa vida, por apresentarem vida útil estendida (CRUZ *et al.*, 2017).

Entre as décadas de 1950 e 1980, os leites pasteurizados detiveram o mercado nacional até que, com a introdução do processo UHT no Brasil, foram perdendo mercado, pois a nova tecnologia favoreceu a logística de distribuição do leite e foi capaz de ampliar o prazo de validade do produto, além de assegurar maior qualidade microbiológica em todo o território nacional (RUBEZ, 2003; VILELA *et al.*, 2017).

Atualmente, os leites consumidos na Austrália, Nova Zelândia, Estados Unidos e Canadá são, majoritariamente, leites pasteurizados, em contraponto, observa-se que o Brasil é um dos maiores consumidores de leite UHT do mundo (ARLA FOODS, 2003; GREENWOOD, 2017).

Em média, o leite bovino apresenta 87% de água e 13% de sólidos, dentre os quais 30% são gorduras, 37% lactose, 27% proteínas e 6% cinzas e minerais. As proteínas do leite são representadas pela caseína (80%) e proteínas do soro (20%), ou seja, proteínas que permanecem solúveis no meio líquido, após a precipitação da caseína, no processo de fabricação de queijos (ANTUNES, 2003).

As caseínas do leite estão estruturalmente arrançadas em quatro diferentes cadeias polipeptídicas: α S1-caseína, α S2-caseína, β -caseína e κ -caseína. Noventa e cinco por cento das caseínas presentes no leite cru estão organizadas em forma de micelas, conferindo maior estabilidade aos tratamentos térmicos aplicados ao leite. Já as proteínas do soro, por serem hidrofóbicas, apresentam um arranjo globular, com grande estruturação secundária e terciária. As principais proteínas do soro são a α -lactoalbumina (α -La) e a β -lactoglobulina (β -Lg). Menores concentrações de albumina do soro bovino (BSA), lactoferrina, peroxidases, lisozimas e imunoglobulinas também estão presentes no soro (GOULDING; FOX; MAHONY 2020).

Apesar de toda a relevância do leite como um alimento nutritivo e versátil, o leite é um dos alimentos que mais causam alergias no mundo, compondo a lista dos oito alimentos mais alergênicos do mundo, segundo FAO, OMS e Codex Alimentarius (ANVISA, 2017). Segundo a Associação Brasileira de Alergia e Imunologia, há 350.000 indivíduos alérgicos às proteínas do leite de vaca (APLV) no Brasil (MILKPOINT, 2017; VILLA *et al.*, 2018).

Atualmente, já se conhecem diversos epítomos alergênicos encontrados nas principais proteínas do leite e sabe-se que cada uma delas apresenta potencial alergênico próprio. As proteínas do soro de leite apresentam a maior alergenicidade no leite bovino, especialmente a α -La e a β -Lg. Esse fato é observado uma vez que estas proteínas apresentam estruturas secundária e terciária mais organizadas, preservando os epítomos após a digestão e/ou processamento do leite. A β -Lg, em especial, por apresentar uma certa resistência à ação das enzimas digestivas humanas, pode preservar diversos epítomos após o processamento ou digestão do leite (RAHAMAN; VASILJEVIC; RAMCHANDRAN, 2016; VILLA *et al.*, 2018).

Em linhas gerais entende-se que as caseínas do leite são proteínas mais estáveis quando o leite é tratado por processamentos térmicos, que gera uma pequena atenuação da alergenicidade e um leve incremento na sua digestibilidade. Já as proteínas do soro, por serem mais sensíveis a esses tratamentos, podem apresentar aumento ou diminuição da alergenicidade, a depender do binômio tempo-temperatura desses tratamentos, visto que quando as proteínas são desenoveladas podem expor mais epítomos, aumentando a alergenicidade (RAHAMAN; VASILJEVIC; RAMCHANDRAN, 2016; VILLA *et al.*, 2018).

Além dos processos térmicos, a homogeneização do leite também apresenta efeitos sobre a digestão e alergenicidade das proteínas lácteas, por alterar a interação entre as micelas de caseína e proteínas do soro com os glóbulos de gordura, que diminuem de tamanho neste tipo de leite (MICHALSKI; JAMUEL, 2006; KOPF-BOLANZ *et al.*, 2014; MALMGREN *et al.*, 2017).

Tendo em vista as alterações conformacionais das proteínas do leite quando submetidas aos processos térmicos e de homogeneização, este estudo teve por objetivo avaliar a digestibilidade e alergenicidade dos leites mais consumidos no Brasil, como os leites pasteurizados, tratados por ultra-alta temperatura (UHT) e em pó.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar de toda a relevância do leite como um alimento nutritivo, ele é um dos alimentos que mais causam alergias no mundo, acometendo principalmente crianças menores de um ano de idade. Estima-se que cerca de 3% das crianças no mundo sofram de alergia à proteína do leite de vaca (APLV), e, no Brasil, as estatísticas apontam uma incidência entre 2 e 6%. Naturalmente, com o avanço da idade, indivíduos alérgicos adquiriam tolerância crescente à essas proteínas, alcançando tolerância total em 95% dos casos ainda na primeira infância. Mais recentemente, dados de diferentes países mostram que essa tolerância progressiva não vem ocorrendo e que cerca de 15% das crianças diagnosticadas permanecem alérgicas na vida adulta, obrigando-as a

restringir o consumo e contato com as proteínas do leite (VILLA *et al.*, 2018; GRAVERSEN *et al.*, 2020).

No Brasil, estima-se que cerca de 20% dos casos de APLV diagnosticados permaneçam na vida adulta. Segundo a Associação Brasileira de Alergia e Imunologia (ASBAI), o Brasil apresenta 350.000 indivíduos alérgicos às proteínas do leite de vaca, com notificação de 70.000 casos de choque anafilático (JACOB *et al.*, 2009; MILKPOINT, 2017).

Esses dados são intrigantes e fazem aumentar o interesse em entender mais sobre essa resposta alergênica persistente na vida adulta, seja identificando os epítomos alergênicos em cada uma das proteínas de leite, seja avaliando e desenvolvendo testes cada vez mais sensíveis e precisos para avaliação e diagnóstico de crianças e para a rotulagem segura em alimentos, ou ainda estudando as relações entre os processamentos de leite e as alterações para cada uma das proteínas na matriz láctea.

Assim sendo, tendo em vista a importância do leite, especialmente do leite bovino, na dieta humana em todas as fases da vida, esse projeto pretende avaliar a digestibilidade e alergenicidade proteica de diferentes leites bovinos comerciais, relacionando a pasteurização e processo de ultra-alta temperatura (UHT) usados na industrialização do leite no Brasil, em comparação com o leite cru.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Leite Bovino

Os benefícios do leite já são amplamente conhecidos pela população em geral, dentre eles a quantidade de proteínas, imprescindível na alimentação de crianças na primeira infância e por ser uma ótima fonte de cálcio, outros sais minerais e vitaminas como A e B6 (VILLA *et al.*, 2018).

Muitas mudanças e progressos ocorreram ao longo da história para que a definição estabelecida pelo MAPA em 2002 e posteriormente no RIISPOA (2020) fosse adotada e aceita até os dias de hoje.

3.2 Mercado no Brasil e no Mundo

A produção e o consumo de leite bovino vêm ganhando destaque no cenário mundial e entre os países mais atuantes nesse contexto estão países da União Europeia, Estados Unidos da América, Índia, China, Rússia e Brasil (Tabela 1). Recentemente, a China vem aumentando a importação de leite UHT, fato que tem incitado a indústria de laticínios de países como Nova Zelândia, Austrália e Alemanha. Em contrapartida, os pasteurizados ainda são mais consumidos nos EUA, Austrália e Nova Zelândia (GREENWOOD, 2017; LIEM *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2021).

Tabela 1. Produção de leite em países selecionados e no mundo de 2016 a 2020 (dados de 2020 são ainda previsão).

PAIS	2016	2017	2018	2019	2020	VAR. 20/19
EU	151,00	153,40	154,57	155,20	156,70	1,0%
EUA	96,36	97,76	98,68	99,05	100,48	1,4%
Índia	78,09	83,63	89,80	92,00	94,00	2,20%
China	30,64	30,38	30,75	32,00	33,00	3,1%
Rússia	30,51	30,93	30,30	30,56	31,00	1,4%
Brasil	22,72	23,62	23,75	24,45	24,95	2,0%
Nova Zelândia	21,22	21,53	22,01	21,85	21,90	0,2%
México	11,95	12,12	12,36	12,65	12,75	0,8%
Argentina	10,19	10,09	10,83	10,64	11,10	4,3%
Outros	45,97	46,51	46,66	45,90	46,42	1,1%
MUNDO	498,65	509,97	519,71	524,30	532,30	1,5%

Fonte: MARTINS *et al.*, 2021

Com o aumento da comercialização do leite UHT nas últimas décadas, este se tornou responsável pela metade das vendas do mercado leiteiro na Europa Ocidental. Segundo pesquisas realizadas pela Arla Foods, grande parte da população dinamarquesa prefere consumir leite fresco, sempre atentando para as datas a fim de realizar uma compra mais assertiva (ARLA FOODS, 2003).

Nos países desenvolvidos, a média de consumo de lácteos por ano é de 220 litros/pessoa, enquanto no Brasil – com produção em torno de 34 bilhões de litros em 2015 – foi constatado valor aproximado de 170 litros de lácteos/pessoa naquele ano. Pesquisas indicam que o uso, por ano, do leite fluido em território nacional é de 60 litros por habitante e o de derivados é de aproximadamente 110 litros por habitante. No ano de 2020, a produção total de lácteos no Brasil alcançou a marca de 35 bilhões de litros e a produção sob inspeção, aproximadamente 25.500 bilhões de litros (Tabela 2) (BRANCO, 2016; ZOCCAL, 2016; MARTINS *et al.*, 2021).

Tabela 2. Balança comercial de lácteos, produção total, produção inspecionada e percentual de leite importado pelo Brasil entre 2010 e 2020 (valores em bilhões de litros ou equivalente litros).

ANO	PRODUÇÃO TOTAL	PRODUÇÃO INSPECIONADA	IMPORTAÇÃO EXPORTAÇÃO	SALDO	IMP / PROD. TOTAL	IMP / PROD. INSPEC.
2010	30.715,5	20.975,5	707,7	- 520,2	2,3 %	3,4 %
2011	32.091,0	21.795,0	1.216,7	- 1.093,1	3,8 %	5,6 %
2012	32.304,4	22.338,3	1.267,5	- 1.152,2	3,9 %	5,7 %
2013	34.255,2	23.552,8	1.066,3	- 933,5	3,1 %	4,5 %
2014	35.124,4	24.747,0	725,7	- 284,8	2,1 %	2,9 %
2015	34.609,6	24.062,3	1.092,2	- 652,9	3,2 %	4,5 %
2016	33.680,4	23.169,7	1.880,5	- 1.644,4	5,6 %	8,1 %
2017	33.312,2	24.333,5	1.270,1	- 1.133,6	3,8 %	5,2 %
2018	33.916,7	24.457,9	1.189,9	- 1.123,2	3,5 %	4,9 %
2019	34.844,9	25.011,8	1.083,0	- 1.018,0	3,1 %	4,3 %
2020	35.000,0	25.525,8	1.338,3	- 1.237,6	3,8 %	5,2 %
Média			1.167,1	- 981,2	3,5 %	4,9 %

Fonte: MARTINS *et al.*, 2021

Segundo o IBGE, a produção de leite de vaca em 2018 superou em 1,6% o número do ano anterior, contando agora com 33,8 bilhões de litros e apresentando como maiores produtores os estados de Minas Gerais (26,4% do total no país), Paraná e Rio Grande do Sul. Com relação às regiões brasileiras, Sul e Sudeste possuem maior expressividade no cenário leiteiro sendo, juntamente, responsáveis por mais de 60% de toda a produção de leite nacional. Apesar da redução de vacas ordenhadas em 2018 observou-se o aumento da quantidade de litros de leite por vaca, ficando acima da média de anos anteriores, mas ainda assim abaixo da produtividade de outros países, à exemplo da Argentina com 6500 litros de leite produzidos por vaca ao ano (MILKPOINT, 2019; 2020).

Tendo em vista a trajetória do consumo de leite no Brasil, que ocorreu a partir de 1961 segundo a FAO, tal avanço iniciou-se em 1980 devido à redução do preço ao produtor e permaneceu em desenvolvimento. Apesar do Brasil ser um dos maiores produtores do mundo, ainda há importação significativa de laticínios para guarnecer o mercado nacional e números pouco expressivos de exportação (Figura 1). Os leites exportados são enviados para Venezuela e países africanos que, em geral, apresentam pouca exigência com relação a qualidade (ZOCCAL, 2016; VILELA *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2021).

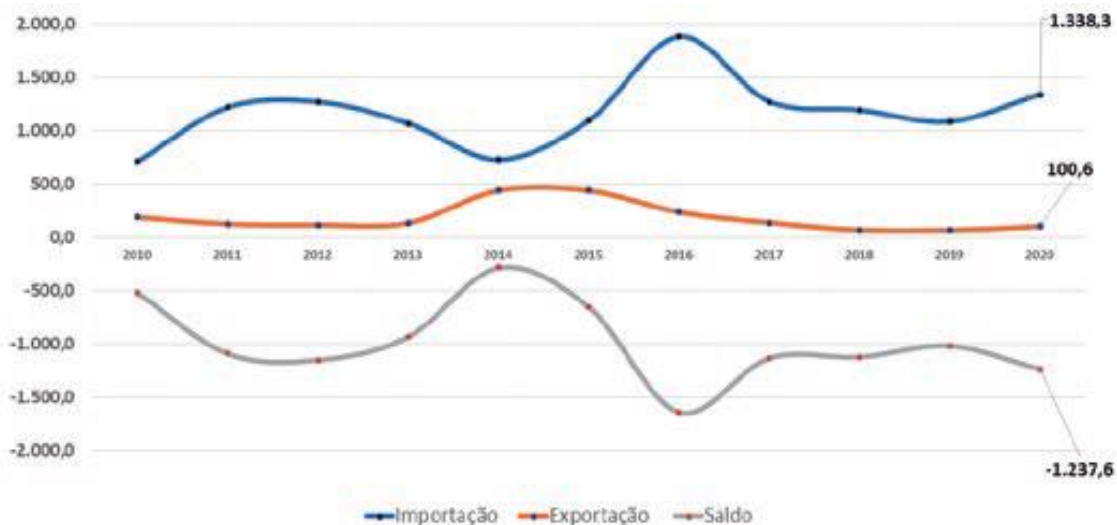


Figura 1. Figura 1. Dinâmica da balança comercial de laticínios do Brasil entre 2010 e 2020 (valores em bilhões de litros equivalentes de leite fluido).

Fonte: MARTINS *et al.*, 2021

3.2.1 Definição e classificação

O padrão de identidade e qualidade do leite, segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) estabelece dentre as características físico-químicas cor, odor e aspecto normais, teor mínimo de gordura, proteína e lactose de 3,0%, 2,9% e 4,3%, respectivamente e pH entre 6,5 e 6,7 (BRASIL, 2020).

Valores fora do padrão de qualidade podem ser encontrados em produtos fraudados ou ainda, em produtos com qualidade e segurança comprometidas. Por se tratar de uma matriz extremamente propícia para o desenvolvimento microbiano e, conseqüentemente, passível de rápida deterioração, faz-se necessário realizar a contagem bacteriana total, assim como a contagem de células somáticas já que a mastite, caracterizada por inflamação nas glândulas mamárias das vacas, é um dos principais problemas de contaminação de leite. Somada a essas contagens, o MAPA (2018) normatizou a realização de análises na etapa de controle e qualidade da matéria prima como requisitos de qualidade a serem alcançados no leite cru, demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Alguns requisitos exigidos pelo MAPA para alcance da qualidade do leite cru refrigerado.

Requisitos	Limites
Gordura	Mínimo de 3,0 (g/100g)
Proteínas	Mínimo de 2,9 (g/100g)
Densidade relativa a 15/15 °C	1,028 a 1,034 g/mL
Acidez titulável	0,14 a 0,18 g de ácido láctico/100 mL
Extrato seco desengordurado	Mínimo de 8,4 g/100g
Contagem padrão em placas	Máximo de 300.000 UFC/mL*
Contagem de células somáticas	Máximo de 500.000 CS/mL*

*: valores referentes a médias geométricas trimestrais
Fonte: MAPA, 2018

Além dos requisitos já citados, existe uma etapa de desnate que consiste na retirada total ou parcial da gordura presente no leite que é classificado em integral, quando possui no mínimo 3%, semidesnatado de 2,9 a 0,6% ou desnatado quando há no máximo 0,5% de gordura (*m/m*). O leite também pode passar pela homogeneização, processo que é aplicado com a finalidade de evitar a separação da nata através da uniformização das fases aquosa e lipídica (RODRIGUES *et al.*, 2013; MAPA, 2018).

3.2.2 Características e composição

Em condições higiênico-sanitárias adequadas, o leite é caracterizado como um líquido homogêneo de cor branco-amarelada opaca, odor suave e sabor adocicado, conferido especialmente pela grande concentração de lactose. O leite é composto majoritariamente por água seguida de lactose, proteínas, gordura e sais minerais, de acordo com a composição centesimal listada na Tabela 4 (SANTOS; EMÍLIO, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Tabela 4. Média dos principais componentes encontrados no leite de vaca.

Componentes	Quantidade (%)
Água	87,50
Gordura	3,60
Proteína	3,60
Lactose	4,60
Sais minerais	0,70

Adaptado de: SANTOS; EMÍLIO, 2006

É importante salientar que a composição química do leite é influenciada por diversos fatores como a raça do animal (Tabela 5), idade e alimentação do animal, tempo de lactação, ordenha, manejo do bezerro, variação do clima e presença ou não de infecções (SANTOS; EMÍLIO, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Tabela 5. Média dos principais componentes químicos do leite de diversas raças de bovinos.

Raça	Água (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Cinzas (%)
Holandesa	88,0	3,4	3,3	4,6	0,7
Zebu	86,2	4,8	3,0	5,3	0,7
Jersey	85,6	5,0	3,8	4,8	0,8
Guernsey	85,8	4,8	3,8	4,8	0,8
Suíça	87,0	3,9	3,4	5,0	0,7

Adaptado de: SANTOS; EMÍLIO, 2006

O Brasil apresenta duas grandes bacias leiteiras, uma no Estado de Minas Gerais e outra no Sul no país e a maior parte do leite produzido e comercializado é oriunda de leites das raças Holandesa e Girolando (MIRANDA *et al.*, 2009; JUNIOR *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2019).

3.3 Aspectos Gerais da Produção de Leite

Na produção primária, leva-se em consideração a produção do leite em si, as instalações, as condições de saúde do animal, dentre outros fatores ligados à produção e produtividade. Já as etapas de beneficiamento, compreendem desde o armazenamento, transporte e todos os processos industriais até que o leite chegue na mesa do consumidor, como mostra a figura 5.



Figura 2. Cadeia produtiva do leite.

Adaptado de Revista Arco, 2016

Há uma série de cuidados necessários para que o produto final esteja em conformidade com as leis vigentes e seja bem aceito pelo consumidor, a começar pelas instalações que devem ter um espaço amplo que permita a circulação de ar e constante limpeza. Outros aspectos são a conservação e desinfecção de equipamentos e utensílios, já que são passíveis de contaminações e entram em contato com o leite, a saúde do gado através de higiene adequada, vacinação e acompanhamento veterinário e a higiene dos colaboradores envolvidos em todo o processo de produção (SANTOS; EMÍLIO, 2006).

Para garantir a qualidade e segurança do leite após a ordenha o mesmo deve ser submetido à filtração que tem por objetivo eliminar sujidades mais robustas, resfriamento para postergar o desenvolvimento microbiano e processo térmico como pasteurização ou UHT. Para que possa ser finalmente comercializado, o leite deve atender a condições ideais de higiene e passar por algumas etapas, que irá gerar os diferentes tipos de leite que estão no mercado, conforme apresentado na Figura 6.

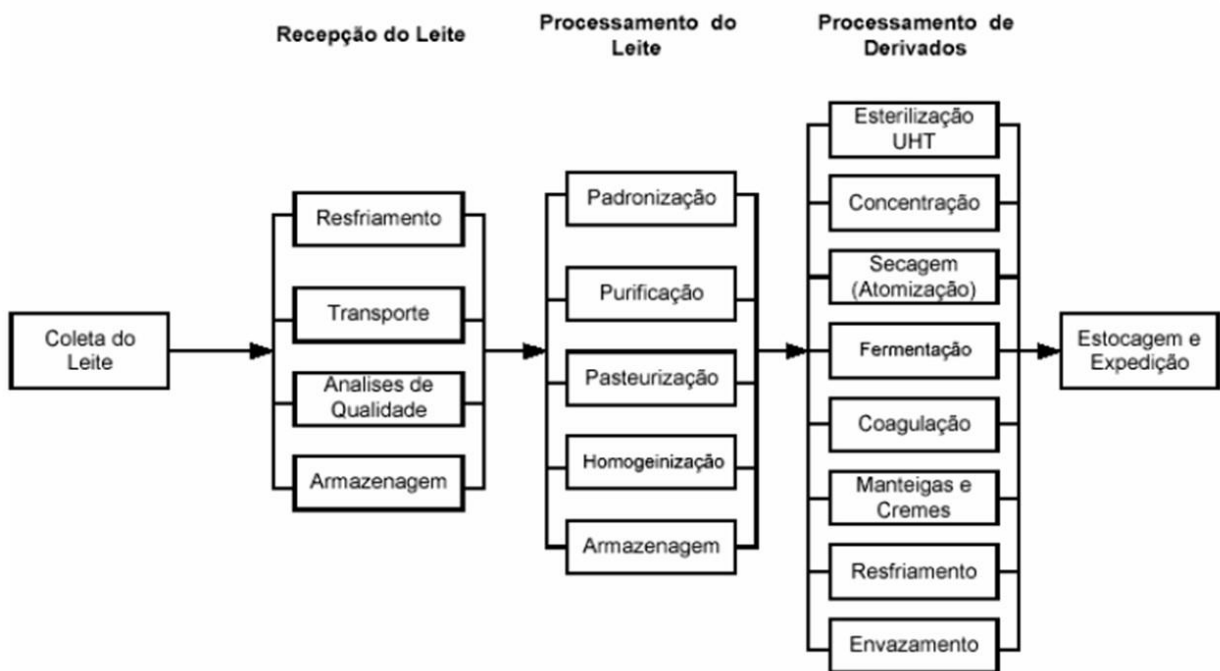


Figura 3. Fluxograma das operações associadas ao beneficiamento do leite.

Fonte: VENTURINI *et al.*, 2007

No que diz respeito ao armazenamento, o regulamento específico para cada tipo de leite deverá ser cumprido. Além disso, o rótulo de cada produto deve ser de fácil compreensão ao público e apresentar, obrigatoriamente, as datas de fabricação e validade, processo térmico utilizado, termo “homogeneizado” caso tenha sido submetido a esse processo e informações de alterações quanto ao teor de lactose e gordura (SANTOS; EMÍLIO, 2006; MAPA, 2011).

3.4 Processamentos de Leite Bovino

Para garantir segurança microbiológica e estender a vida de prateleira do leite alguns procedimentos térmicos são realizados, dentre eles destacam-se a pasteurização e UHT.

3.4.1 Pasteurização

A pasteurização tem como matéria-prima o leite cru refrigerado e visa eliminar os microrganismos patogênicos e reduzir os responsáveis pela deterioração por meio do

aquecimento do leite na faixa de 62 a 65 °C por 30 minutos, na pasteurização lenta e de 73 a 75 °C por 15 a 20 segundos, na pasteurização rápida (BRASIL, 2017). Em cada um dos casos esse processo ocorre em um pasteurizador (Figura 7) no qual o leite é imediatamente resfriado a 4 °C através de um trocador de placas com circuito de água gelada. Depois da pasteurização o leite é acondicionado em embalagens plásticas esterilizadas por luz ultravioleta e pode ser armazenado sob refrigeração por aproximadamente 5 dias. Uma grande desvantagem é que esse processo não é capaz de eliminar bactérias esporuladas, como dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. (WADA; LONNERDAL, 2014; VIDAL; SARAN NETTO, 2018).



Figura 4. Foto de um pasteurizador de placas.

Fonte: <http://tekmlk.com.br/index.php/sobre/equipamentos-para-laticinios/431-equipamentos-30>

3.4.2 Ultra alta temperatura (UHT)

Esse procedimento tem por objetivo eliminar todos os microrganismos relevantes para comercialização do leite, que aliado ao envase sob condições assépticas e em embalagens hermeticamente fechadas prolongam consideravelmente a vida útil do produto (em torno de 4 meses a temperatura ambiente), o que justifica ser conhecido como “leite longa vida”. Nesse processo térmico o leite refrigerado a 4 °C é colocado no equipamento de ultra alta temperatura (Figura 8), no qual é aquecido com fluxo contínuo por trocadores de calor no caso do método indireto ou por injeção de vapor caso seja utilizado método direto de aquecimento. Esse

aquecimento ocorre entre 135 a 150 °C por 2 a 4 segundos e resfriado rapidamente a temperatura inferior a 32 °C (CHAVAN *et al.*, 2011; WADA; LONNERDAL, 2014; BRASIL, 2017; VIDAL; SARAN NETTO, 2018).

Além do produto permanecer seguro por meses antes de aberto, uma grande vantagem desse método é que devido à alta temperatura empregada, os esporos não resistem. Uma outra grande vantagem é o armazenamento à temperatura ambiente, dispensando a cadeia de frio no pós-processamento. No entanto, características sensoriais como sabor e aroma do leite podem ser alteradas (DATTA; DEETH, 2003; WADA; LONNERDAL, 2014).



Figura 5. Equipamento para tratamento de UHT.

Fonte: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/tetra-pak-lanca-novo-equipamento-para-o-tratamento-uht-de-laticinios-87300n.aspx>

3.4.3 Homogeneização

Esse processo é realizado para que haja redução do tamanho dos glóbulos de gordura, podendo passar de 3 - 5 a 0,03 - 2 μm , não separando as fases do fluído, evitando assim, a floculação do leite. Tal processamento se dá através de um homogeneizador, no qual o leite é inserido com intensa pressão à temperatura de 65 a 70 °C e passa pela parede do tubo após ultrapassar a barreira oferecida pela trava. O fato de conseguirem perpassar por esse canal apertado que leva à diminuição dos glóbulos de gordura (ORDÓNEZ, 2005).

Essa técnica é interessante no que diz respeito ao mercado consumidor, já que torna o aspecto do leite mais agradável e promove melhoria na palatabilidade, além de corrigir a separação de fases que pode ocorrer ao longo do processo de UHT (NUORA *et al.*, 2018).

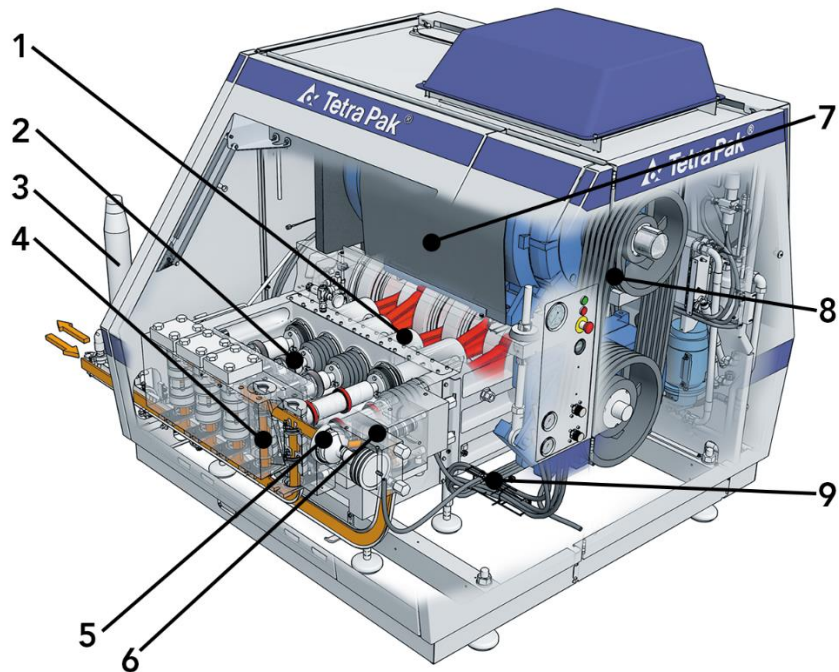


Figura 6. Esquema demonstrando o funcionamento do homogeneizador.

1. Bloco do motor; 2. Pistões; 3. Amortecedor; 4. Bloco de bomba; 5. Dispositivo de homogeneização, primeiro estágio; 6. Dispositivo de homogeneização, segundo estágio; 7. Motor de acionamento principal; 8. Transmissão por correia em V; 9. Sistema de configuração de pressão hidráulica.

Fonte: TETRA PAK, 2021.

3.4.4 Desidratação

A obtenção do leite em pó é dada a partir do leite já processado termicamente e homogeneizado, conduzido à concentração em um evaporador que elimina parcialmente a água presente no leite, podendo chegar ao teor de 30 a 40% de extrato seco. Posteriormente, esse produto é submetido à desidratação total através da secagem por atomização (ou *spray drying*) (Figura 10), que resulta no pó posteriormente envasado (VIDAL; SARAN NETTO, 2018; LIU *et al.*, 2020).

Dentre as vantagens do leite ser comercializado na forma de pó pode-se citar a melhoria na logística de transporte e a grande durabilidade do produto, preservando as características nutricionais do alimento quando na fase líquida (MUNIR *et al.*, 2018; FIALHO *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2020; ZOUARI *et al.*, 2020).

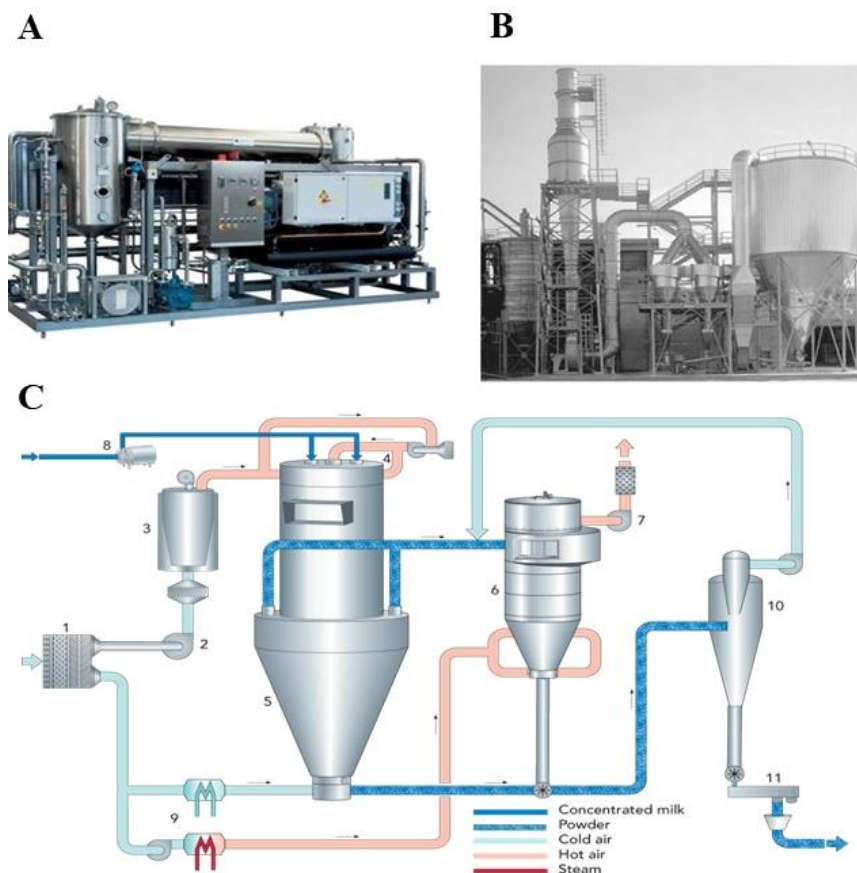


Figura 7. Atomizador para secagem de leite (A); Equipamento industrial (B); Componentes do equipamento (C).

1. Filtro de entrada; 2. Ventilador de entrada; 3. Aquecedor de ar; 4. Distribuidor de ar; 5. Câmara de secagem; 6. Sacos de filtro; 7. Exaustor; 8. Bomba de alta pressão; 9. Leito fluido; 10. Unidades de tratamento de ar; 11. Ciclone.

Fontes: TETRA PAK, 2021; <https://www.directindustry.com/pt/prod/reda-spa/product-193726-2022956.html>; <https://betaeq.com.br/index.php/2017/08/18/secagem-industrial/>.

3.1 Proteínas Lácteas

Como já citado, o leite possui, aproximadamente, 3,5% de proteínas, que são divididas em dois grandes grupos: caseínas e proteínas do soro, compondo 80% e 20% das proteínas do leite, respectivamente. As caseínas são codificadas por diferentes genes localizados no mesmo cromossomo, sendo, portanto, estruturalmente arranjadas em quatro diferentes cadeias

polipeptídicas: α 1-, α 2-, β - e κ -caseína, que estão presentes em diferentes concentrações no leite (Tabela 6).

As proteínas do soro são compostas majoritariamente por α -lactalbumina e β -lactoglobulina, sendo essa última a mais abundante (80% das proteínas do soro); e as que se apresentam em menor quantidade são imunoglobulinas, albumina, pequenas quantidades de enzimas, lisozima e lactoferrina, assim como algumas outras com atribuições específicas (GOULDING; FOX; MAHONY, 2020).

Tabela 6. Principais proteínas encontradas no leite.

Proteínas	Quantidade no leite (g/L)
CASEÍNAS	24 – 28
α 1	12 – 15
α 2	3 – 4
B	9 – 11
K	3 – 4
PROTEÍNAS DO SORO	
β -lactoglobulina	2 – 4
α -lactoalbumina	1 – 1,5
Albumina sérica	0,1 – 0,4
Imunoglobulinas	0,6 – 1,0
Lactoferrina	~0,1
Proteína da membrana dos glóbulos de gordura	~0,4
Total de proteínas do leite	30 – 35

Fonte: BRASIL *et al.*, 2015

3.1.1 Caseínas

Representando maior parte das proteínas do leite, as caseínas possuem a função de transportar minerais como cálcio e fosfato da glândula mamária para o recém-nascido. Apesar da grande quantidade de cálcio que passa pelo tecido mamário não há calcificações em virtude do transporte via caseína. Esse grupo de proteínas também é responsável pela coloração branca do leite através da dispersão da luz por suas estruturas organizacionais conhecidas como micelas (OLIVEIRA; TIMM, 2007; DAY *et al.*, 2017; GOULDING; FOX; MAHONY, 2020).

A caseína é caracterizada como uma proteína anfipática por ter porções hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo as porções hidrofóbicas as mais expostas, pela conformação final das proteínas, o que leva a sua insolubilidade em água. Caseínas das famílias α_1 , α_2 , β e κ possuem massa molecular aproximadas de 23, 25, 24 e 19 kDa, respectivamente, sendo a κ -caseína a única glicosilada (MICIŃSKI *et al.*, 2013; VILLA *et al.*, 2018; GOULDING; FOX; MAHONY, 2020).

Mais abundante no leite bovino, a caseína α_1 é formada por duas proteínas (α_0 e α_1) altamente fosforiladas que possuem, em sua estrutura primária, a mesma sequência de aminoácidos, tendo a α_1 como proteína principal. A migração eletroforética das proteínas constituintes do grupo da α_2 (α_2 , α_3 , α_4 , α_5 e α_6) conduz essas proteínas a uma localização entre as bandas correspondentes às caseínas α_1 e β . Os grupos pertencentes à caseína α são sensíveis à presença de cálcio levando à sua precipitação (SGARBIERI, 2005; OLIVEIRA; TIMM, 2007; MATRICARDI *et al.*, 2016).

Já a β -caseína é a proteína mais hidrofóbica entre as caseínas e, devido ao fato de ser mais fosforilada que a κ -, possui maior sensibilidade à alta concentração de cálcio. No entanto, ela não reage à essa concentração precipitando como α -caseína, mas sim organizada no estado de suspensão. No que diz respeito a κ -caseína, seus sítios de glicosilação são definidos pela estrutura secundária e terciária da molécula. Na extremidade da estrutura primária da κ -caseína que fica em contato com o soro do leite há a região denominada como glicomacropéptido (GMP) que apresenta maioria dos aminoácidos hidrofílicos. Já a região aminoterminal, para- κ -caseína, possui atributo de insolubilidade devido ao acúmulo de aminoácidos básicos e hidrofóbicos (NG-KWAI-HANG *et al.*, 2011; VILLA *et al.* 2018; GOULDING; FOX; MAHONY, 2020).

As caseínas são encontradas no arranjo estrutural de micelas, que são “nanopartículas coloidais auto-montadas consistindo em quatro tipos de proteínas de caseína (numa proporção aproximada de 4: 1: 4: 1) e minerais na forma de fosfato de cálcio coloidal”. Ao longo do tempo surgiram diversas teorias acerca da estrutura micelar das caseínas, no entanto ainda não há unanimidade da ciência nesse quesito. Existe consenso de que a micela é formada por subunidades (Figura 11), denominadas de submicelas, e no tocante à orientação das proteínas no arranjo: as porções hidrofílicas das α_1 -, α_2 - e β -caseínas ficam voltadas para o lado externo das submicelas, enquanto a κ -caseína reveste, majoritariamente, a micela. Além disso, outro fator de comum acordo atualmente é a presença de aglomerados de fosfato de cálcio, que unem as proteínas das submicelas gerando assim, as micelas (DAY *et al.*, 2017; GOULDING; FOX; MAHONY, 2020).

De forma geral pode-se afirmar que a κ -caseína é de suma importância para que a estabilidade da micela seja mantida, pois a região da para- κ -caseína (aminoterminal) é situada no interior da micela e interage com as caseínas α e β em decorrência de sua natureza apolar. Já o GMP (região carboxiterminal) encontra-se no exterior da superfície da micela e, em virtude de sua polaridade, permanece em contato com a água, possibilitando dessa forma, a homogeneidade entre a fase do soro no leite. Sendo assim, se a camada externa à superfície da micela composta por GMP for destruída ou removida, sua estabilidade será severamente prejudicada e torna-se suscetível à agregação (SGARBIERI, 2005; GOULDING; FOX; MAHONY, 2020).

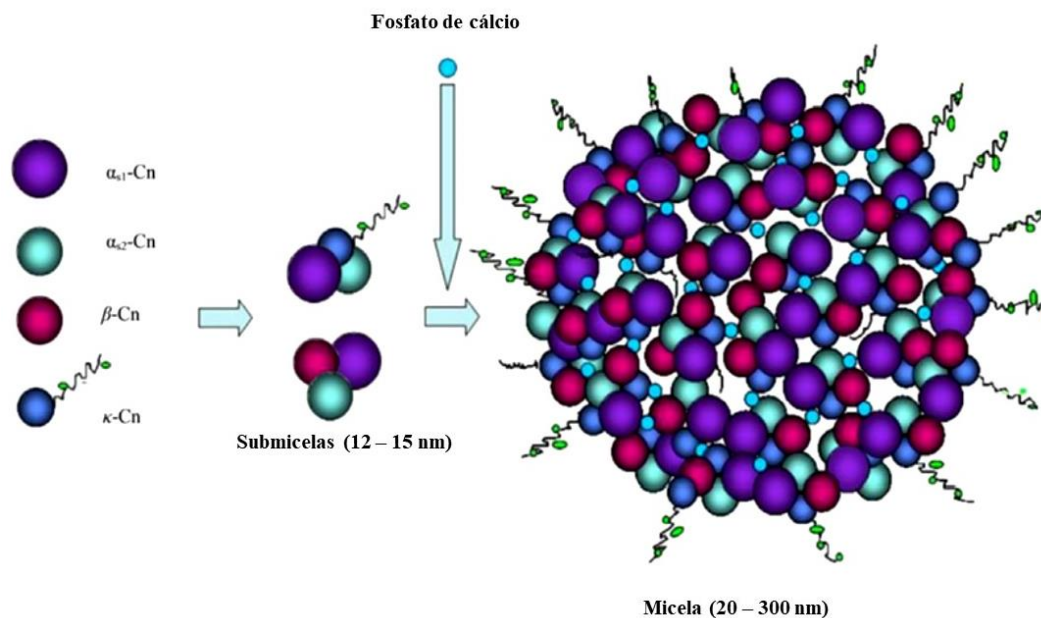


Figura 8. Estrutura das micelas e submicelas de caseína.

Adaptado de VILLA *et al.*, 2018.

Quando o leite bovino encontra-se em condições usuais, como pH em torno de 6,5, as micelas são capazes de suportar temperaturas de até 140 °C por até 20 minutos. Contudo, se a temperatura for muito elevada os níveis de cálcio presente na micela aumentam e acarreta na desagregação da κ -caseína, prejudicando o equilíbrio micelar. Além da temperatura, outros fatores como pH, hidrólise enzimática e aumento de cálcio influenciam na estabilidade das micelas de caseína. No caso da hidrólise, a cadeia polipeptídica da κ -caseína é rompida, pela ação de endopeptidases, resultando na liberação dos peptídeos GMP e para- κ -caseína e, conseqüentemente, a desestabilização do arranjo micelar e precipitação das caseínas. O equilíbrio também é afetado quando o leite é submetido a um potencial hidrogeniônico abaixo de 6,2 que

leva ao aumento da concentração de cálcio (BRASIL *et al.*, 2015; GOULDING; FOX; MAHONY, 2020).

Algumas características próprias do leite como a coloração, resistência ao calor e a coagulação são atribuídas a presença das micelas de caseína e tem importância no processamento do leite e sua transformação em diversos produtos lácteos, como queijos e iogurtes, o que as tornam estruturas interessantes a serem estudadas para fins tecnológicos (FOX; BRODKORB, 2008; DAY *et al.*, 2017).

3.1.2 Proteínas do soro de leite

São as proteínas que permanecem solúveis no meio aquoso após o processo de precipitação das caseínas, como observado nos processos de fabricação de derivados de leite como a de queijo, por exemplo. São caracterizadas por serem proteínas globulares e compostas majoritariamente por porções hidrofóbicas, que quando enoveladas adquirem conformação que promove sua solubilidade. Proteínas do soro possuem grande valor nutritivo, pois nelas estão contidas a maioria dos aminoácidos essenciais como isoleucina, lisina, triptofano, além de apresentarem alta digestibilidade. Dentre suas ações e benefícios para o organismo podem ser citadas o fornecimento de energia, reparação celular, atividade antimicrobiana, imunomoduladora e anti-hipertensiva (SGARBIERI, 2017; DEETH *et al.*, 2019; GOULDING; FOX; MAHONY, 2020).

A β -lactoglobulina (β -Lg), proteína de maior concentração no soro, possui massa molecular média de 18,4 kDa, que em geral apresentam-se como um dímero (aproximadamente 36 kDa) nos organismos e é constituída por nove folhas β dispostas de forma anti-paralela que, estabilizadas por ligações de dissulfeto, formam um cálice juntamente com 3 giros de α hélice (Figura 12), podendo interagir com moléculas apolares na parte interna. Diversos fatores influenciam na formação de dímeros de β -Lg ou em sua dissociação, como temperatura e pH. No entanto, quando apresentam-se dimerizadas são digeridas no intestino delgado por serem mais resistentes à enzimas do estômago (ALMEIDA *et al.*; 2013; DEETH *et al.*, 2019).

Uma característica notável da β -Lg é sua capacidade de se complexar às vitaminas A (retinol) e D e transportá-las. Adicionalmente, possui atividade antioxidante por evitar a aniquilação da vitamina C em altas temperaturas, efeito antimicrobiano, imunomodulador, anti-hipertensivo e seus derivados peptídicos demonstraram auxiliar na diminuição da absorção do colesterol (ALMEIDA *et al.*; 2013; DEETH *et al.*, 2019).

Em geral, a β -Lg é estável dentro da faixa de pH entre 3,5 e 7,5, sendo irreversivelmente desnaturada quando submetida à condição altamente alcalina. Com relação a temperatura, sua estrutura sofre alterações reversíveis até 60 °C e irreversíveis entre 60 – 70 °C. Quando exposta a temperaturas ainda mais altas ocorre agregação com outras proteínas como caseínas, por exemplo (SGARBIERI, 2005; DEETH *et al.*, 2019).

Seu caráter hidrofóbico confere aplicações diferenciadas de sua estrutura como emulsificação, geleificação e intensificação de aroma e sabor, que podem ser exploradas na indústria alimentícia (STANIC-VUCINIC *et al.*, 2012; GOULDING; FOX; MAHONY, 2020).

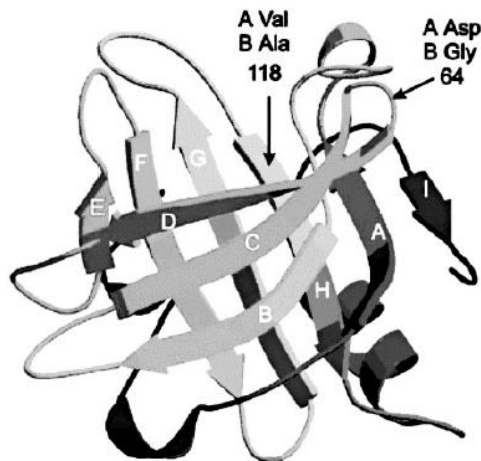


Figura 9. Estrutura terciária da β -lactoglobulina.

Fonte: SGARBIERI, 2005

A segunda proteína mais abundante no soro do leite, a α -lactoalbumina (Figura 13), possui grande quantidade de lisina, leucina, treonina, cistina e triptofano, apresenta massa molecular de 14,2 kDa e uma estrutura no formato de elipse, dividida em duas regiões por uma fenda. A α -La tem capacidade de se acoplar a determinados micronutrientes como cálcio, zinco e manganês e, em virtude da conformação estrutural, é rapidamente digerida pelo trato digestivo humano e pode ter absorção facilitada (SGARBIERI, 2005; GOULDING; FOX; MAHONY, 2020).

A afinidade dessa proteína por cálcio mostrou-se fundamental para criação da ligação dissulfeto, seu enovelamento ideal e proteção contra desnaturação por temperatura. No tocante à sua estabilidade térmica, sabe-se que, a 64 °C, a α -La sofre desnaturação reversível, o que não ocorre quando é encontrada em mistura com outras proteínas do soro e aquecida, sendo dessa forma, desnaturada irreversivelmente. Quando expostas a temperaturas elevadas, as ligações dissulfeto são rompidas tornando-a disponível para interagir, através de ligações intermoleculares, com regiões compatíveis da β -Lg (SGARBIERI, 2005; DEETH *et al.*, 2019).

Dentre as funções biológicas da α -La destaca-se a regulação da síntese de lactose, já que sua interação com a enzima responsável por essa produção – β -1,4-galactosiltransferase – intensifica sua afinidade pela glicose, gerando dessa forma, aumento na concentração de lactose no leite. Estudos demonstraram ação anti-câncer de α -La em um estado fundido parcialmente enovelado que ao entrar em contato com ácido oleico, em condições específicas de pH, assume especialidade apoptótica contra as células cancerígenas e jovens não diferenciadas sem afetar

células maduras saudáveis. Embora essa atividade tenha sido descrita primariamente para α -La de humanos, foi observado efeito similar em α -La oriundos de leite de outras espécies, como o bovino. Outras características interessantes se devem a seus derivados peptídicos que apresentam atividade antimicrobiana e a abundância do aminoácido triptofano, por ser precursor da serotonina, conhecida por hormônio do “bem-estar” (ALMEIDA *et al.*; 2013; DEETH *et al.*, 2019).

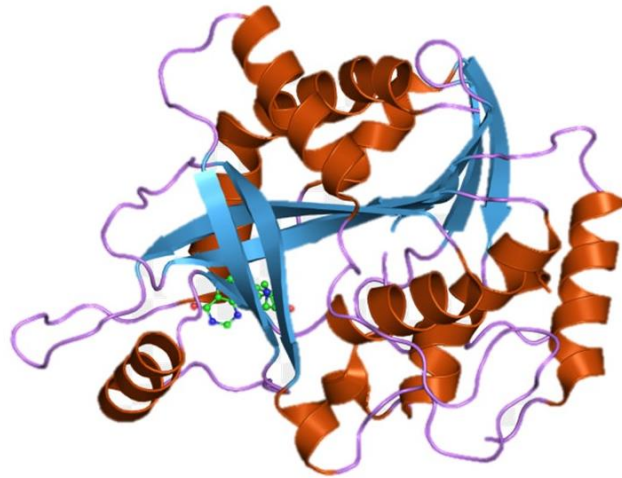


Figura 10. Estrutura terciária da α -lactoalbumina.

Adaptado de <https://www.freepng.es/png-1bg9fi/>

As proteínas do soro de leite vêm sendo aproveitadas na indústria de alimentos devido a seu alto valor biológico e por conferirem características sensoriais e tecnológicas desejáveis aos produtos finais, como em requeijão e bebidas lácteas. Comparativamente, a α -LA é mais estável a temperaturas elevadas, como as empregadas no processo UHT, em que aproximadamente 90% da β -Lg é desnaturada. Em consequência dessa desnaturação ocorre a agregação de outras proteínas com a β -Lg, que é um fator relevante para criação de géis e na inconveniente formação de incrustações em equipamentos das indústrias de laticínios (SGARBIERI, 2005; DEETH *et al.*, 2019).

3.2 Alergia à Proteína do Leite de Vaca

A alergia alimentar, definida como “uma resposta imunológica adversa aos alérgenos alimentares” (FERREIRA; SEIDMAN, 2007), tem tomado maiores proporções nas últimas décadas e representado um problema de saúde pública, sendo crianças as mais atingidas. Nesse contexto, é necessário compreender as distinções entre alergia, que se caracteriza por hipersensibilidade não comum a pessoas normais, e intolerância alimentar, que segundo Ferreira e Seidman (2007) “sugere uma resposta fisiológica anormal a um agente que não é imunomediada”.

No que diz respeito ao leite de vaca, a intolerância ocorre com o açúcar mais abundante no leite, a lactose. A intolerância à lactose caracteriza-se pela não degradação desse açúcar devido à ausência da enzima lactase, já a alergia à proteína do leite de vaca (APLV) ocorre quando o sistema imunológico reconhece partes das proteínas do leite como antígenos, o que gera respostas imunes exacerbadas, desencadeando o processo alérgico (GASPARIN; TELES; DE ARAÚJO, 2010).

Quando o sistema imunológico trabalha a fim de combater um antígeno e gera respostas inflamatórias exacerbadas, esse mecanismo é chamado de hipersensibilidade, que é classificada em tipo I – mediada por IgE –, tipo II – citotoxicidade –, tipo III – imunocomplexos – e tipo IV – celular – (Figura 14), sendo os tipos I, III e IV as mais comuns em se tratando de APLV (GASPARIN; TELES; DE ARAÚJO, 2010).

	Tipo I	Tipo II		Tipo III	Tipo IV		
Reagente imune	IgE	IgG		IgG	Células T _H 1	Células T _H 2	CTL
Antígeno	Antígeno solúvel	Antígeno associado à célula ou matriz	Receptor de superfície celular	Antígeno solúvel	Antígeno solúvel	Antígeno solúvel	Antígeno associado à célula
Mecanismo efetor	Ativação de mastócitos	Complemento, células FcR ⁺ (fagócitos, células NK)	Anticorpos alteram a sinalização	Complemento, fagócitos	Ativação de macrófagos	Produção de IgE, ativação de eosinófilos, mastocitose	Citotoxicidade
Exemplo de reação de hipersensibilidade	Rinite alérgica, asma, anafilaxia sistêmica	Algumas alergias a fármacos (p. ex., penicilinas)	Urticária crônica (anticorpo contra FcεR1 α)	Doença do soro, reação de Arthus	Dermatite de contato, reação da tuberculina	Asma crônica, rinite alérgica crônica	Rejeição de enxerto

Figura 11. Mecanismos dos tipos de hipersensibilidade.

Fonte: https://aprender.ead.unb.br/pluginfile.php/108035/mod_resource/content/1/Hipersensibilidades%20e%20Alergias%20e%20doencas%20autoimunes.pdf

Dentre os sinais e sintomas mais típicos da APLV encontram-se náuseas, dores abdominais, diarreias, vômitos, refluxo, cólicas, constipação intestinal e por vezes alterações cutâneas e respiratórias. Nos casos mais extremos da alergia ocorre anafilaxia, manifestação que envolve diversos sistemas do organismo e pode resultar em morte. Há sintomas que surgem em até duas horas após a ingestão do leite (reações imediatas mediadas por IgE), além de outros que surgem tardiamente, após horas ou dias da ingestão. Essas são reações tardias, não mediadas por IgE, como exemplificados na Figura 15 (MACITELLI, 2011; GIANNETTI *et al.*, 2021).

REAÇÕES IMEDIATAS	REAÇÕES TARDIAS
<ul style="list-style-type: none"> • Anafilaxia • Urticária aguda • Angioedema agudo • Sibilos • Rinite • Tosse seca • Vômitos • Edema de laringe • Asma aguda com desconforto respiratório grave 	<ul style="list-style-type: none"> • Dermatite atópica • Diarréia crônica, fezes com sangue, anemia ferropriva, doença do refluxo gastroesofágico, constipação, vômitos crônicos, cólica • Déficit de crescimento • Enteropatia com perda protéica, com hipoalbuminemia • Enterocolite • Esôfagogastroenteropatia eosinofílica confirmada por biópsia

Figura 12. Reações de hipersensibilidade imediatas e tardias após ingestão de leite de vaca em indivíduos com APLV.

Adaptado de MACITELLI, 2011.

3.2.1 Epidemiologia

A alergia à proteína do leite de vaca é a alergia alimentar mais comum entre crianças, tendo sido clinicamente observada em 1 a 17% dos bebês e com prevalência estimada de 0,5 a 3% em crianças de até um ano de idade ao redor do mundo. Historicamente, as crianças alérgicas apresentavam um quadro evolutivo muito positivo, no qual aproximadamente 50% desenvolviam tolerância à essas proteínas por volta dos 5 anos e 75% dos pacientes, no início da adolescência (FLOM; SICHERER, 2019; GOLKAR; MILANI; VASILJEVIC, 2019; GRAVERSESEN *et al.*, 2020)

Entretanto, dados estatísticos mostram que essa tolerância progressiva não vem ocorrendo e que cerca de 15% das crianças diagnosticadas em diferentes países e 20% no contexto brasileiro permanecem alérgicas na vida adulta, obrigando-as a fazer isenção do consumo e contato com as proteínas do leite, não só na alimentação, mas em outros produtos, como cosméticos, por exemplo. Curiosamente, 0,3% de crianças acima de 6 anos e adolescentes e aproximadamente 0,5% dos adultos sofrem com APLV mesmo que tiverem sido alimentados exclusivamente com leite materno durante a lactação (CALDEIRA; CUNHA; FERREIRA, 2011; MACITELLI, 2011; GIANNETTI *et al.*, 2021).

Crianças afetadas pela APLV, podem ser classificadas em dois grupos da alergia mediada por IgE: pacientes do tipo I, caracterizadas por apresentarem a doença de forma passageira, que eliminam respostas de Th2 aos epítomos específicos e reações alérgicas; apresentando constância na alergia, os do tipo II não conseguem desestabilizar a célula Th2. De acordo com Caldeira, Cunha e Ferreira (2011), pessoas com a alergia não mediada por IgE tem o quadro extinto mais cedo em comparação às com APLV mediada por IgE que podem ficar livres da doença aos 8 anos (VILLA *et al.*, 2018).

3.2.2 Diagnóstico, tratamento e prevenção

Atualmente o diagnóstico de APLV é dado em função da anamnese e informações clínicas, dieta de restrição, detecção de IgE específica e teste de provocação oral, no qual são observadas possíveis reações mediante oferta de um alimento contendo o alérgeno ou placebo em doses crescentes. O teste considerado como padrão ouro para o diagnóstico é esse desencadeamento duplo-cego controlado por placebo, onde médico e paciente não tem conhecimento do que está sendo administrado, evitando assim qualquer tipo de influência das partes envolvidas (GASPARIN; TELES; DE ARAÚJO, 2010; MACITELLI, 2011; GIANNETTI *et al.*, 2021).

O tratamento consiste basicamente em dietoterapia, na qual há exclusão de leite e derivados, mesmo que se apresentem em quantidades ínfimas, pois para os portadores dessa alergia qualquer traço da proteína pode causar as reações alérgicas. Em alguns casos o paciente pode tornar-se assintomático após determinado período de tratamento, porém a reintrodução alimentar deve se dar gradativamente e sempre com acompanhamento médico (GASPARIN; TELES; DE ARAÚJO, 2010; MACITELLI, 2011; GIANNETTI *et al.*, 2021).

As alergias de forma geral são dadas por fatores genéticos e ambientais, o que torna sua prevenção um pouco mais restrita. No entanto, a exposição aos alérgenos é demonstrada como principal fator de risco para desenvolvimento da APLV (SANTOS; EMÍLIO, 2006; GIANNETTI *et al.*, 2021).

3.3 Digestibilidade das Proteínas Lácteas

Ao estudar alergia alimentar é necessário atentar para a capacidade do alérgeno de ser digerido no trato gastrointestinal e ter seus epítomos (porções alergênicas dos antígenos) apresentados no lúmen intestinal ou sendo absorvidos pela barreira intestinal. Nem todas as proteínas são totalmente clivadas durante a digestão liberando todos seus aminoácidos, algumas são clivadas em peptídeos maiores que preservam ou intensificam determinadas estimulações ao sistema imune, como a ligação a IgE (BENEDE *et al.*, 2014; KOPF-BOLANZ *et al.*, 2014).

As proteínas do leite bovino apresentam uma das maiores digestibilidades entre as proteínas mais comuns na alimentação, com aproximadamente 95%, sendo de 94% e 97% os valores referentes à digestibilidade das caseínas e proteínas do soro, respectivamente. Durante a digestão, a caseína sofre alterações conformacionais devido à sua susceptibilidade às enzimas

digestivas. Apesar disso, sua hidrólise resulta numa lenta emissão de aminoácidos no sangue, que demora aproximadamente sete horas para ser absorvida. Em contraponto, as proteínas do soro são caracterizadas também pela rápida liberação aminoacídica para o sangue com sua absorção em torno de duas horas após a ingestão (ALMEIDA *et al.*; 2013; BENEDE *et al.*, 2014; DUPONT; TOMÉ, 2020).

Em procedimentos de simulação de digestão observa-se que, cerca de 30 minutos depois da digestão, menos de 25% das caseínas se mantêm íntegras, o que difere da β -Lg, por exemplo, que pode não ser afetada na fase gástrica, podendo permanecer intacta após uma hora de digestão simulada. Tendo em vista essa resistência da β -Lg à proteólise e a possibilidade de não ser bem digerida estômago, o potencial alergênico conferido especificamente por essa proteína pode não ser reduzido após essa fase inicial da digestão (BOSSIOS *et al.*, 2011; DUPONT; TOMÉ, 2020).

3.4 Relação de Processamentos com a Alergia e Digestibilidade

O processamento de alimentos pode alterar a estrutura das proteínas, seja por glicosilação, reação de Maillard, agregação ou desnovelamento, influenciando nas ligações feitas pela imunoglobulina E, fato diretamente relacionado ao potencial alergênico das proteínas. Estudos demonstraram que o consumo do leite cru pode ajudar na proteção contra alergias e asma, no entanto, essa possibilidade é limitada dados os riscos de contaminação microbiana (BU *et al.*, 2013; BOGAHAWATHTHA; CHANDRAPALA; VASILJEVIC, 2017; VILLA *et al.*, 2018).

Sabe-se que as caseínas são termoestáveis e para comprovar sua resistência a processamentos térmicos como pasteurização e UHT, um estudo de Bogahawaththa, Chandrapala e Vasiljevic (2017) submeteu o material a alta temperatura durante o período de uma hora e foi verificado que não houve alteração na alergenicidade dessas proteínas. Em contrapartida, proteínas do soro são mais termolábeis, podendo gerar, portanto mudanças no perfil de imunogenicidade. (BOGAHAWATHTHA; CHANDRAPALA; VASILJEVIC, 2017; VILLA *et al.*, 2018).

Como demonstrado na Figura 16, a alergenicidade conferida pela β -lactoglobulina varia de acordo com a faixa de temperatura a que é submetida. Durante a desnaturação entre aproximadamente 50 a 90 °C alguns epítomos antes escondidos tornam-se disponíveis e levam ao aumento da antigenicidade, e quando exposta a temperaturas acima de 90 °C, gera aumento nas mudanças estruturais, seja eliminando ou camuflando determinados epítomos, que resultam na redução da alergenicidade. Comparativamente, a α -lactalbumina é mais estável, contudo, quando exposta a altas temperaturas revela queda na imunogenicidade, já que os epítomos conformacionais, inacessíveis ou extintos nessa condição de temperatura, apresentam maior reatividade à IgE. Outro fato que acontece com essas duas proteínas quando expostas a altas temperaturas (acima de 90 °C) é a formação de pontes dissulfeto, que levam à associação à outras proteínas tornando os epítomos indisponíveis resultando assim, na redução de alergenicidade (BU *et al.*, 2013; BOGAHAWATHTHA; CHANDRAPALA; VASILJEVIC, 2017; VILLA *et al.*, 2018).

Wada e Lonnerdal (2014) demonstraram esse fenômeno em estudo, no qual foi observada agregação de proteínas no leite UHT e não no pasteurizado. De acordo com as análises

realizadas, os leites cru e pasteurizado possuíam o mesmo padrão proteico, a partir do que se pode inferir que tanto o tratamento térmico quanto a digestão não influenciaram de forma significativa o comportamento proteico. Estudos revelaram que, mesmo que o leite seja submetido a processamento térmico, pessoas alérgicas à proteína do leite de vaca continuavam apresentando IgE específico para caseínas. Em contraste, perfis eletroforéticos apontam que a digestão das proteínas do leite, mais especificamente da β -Lg, foi facilitada pelo processo UHT (WADA; LONNERDAL, 2014; VILLA *et al.*, 2018).

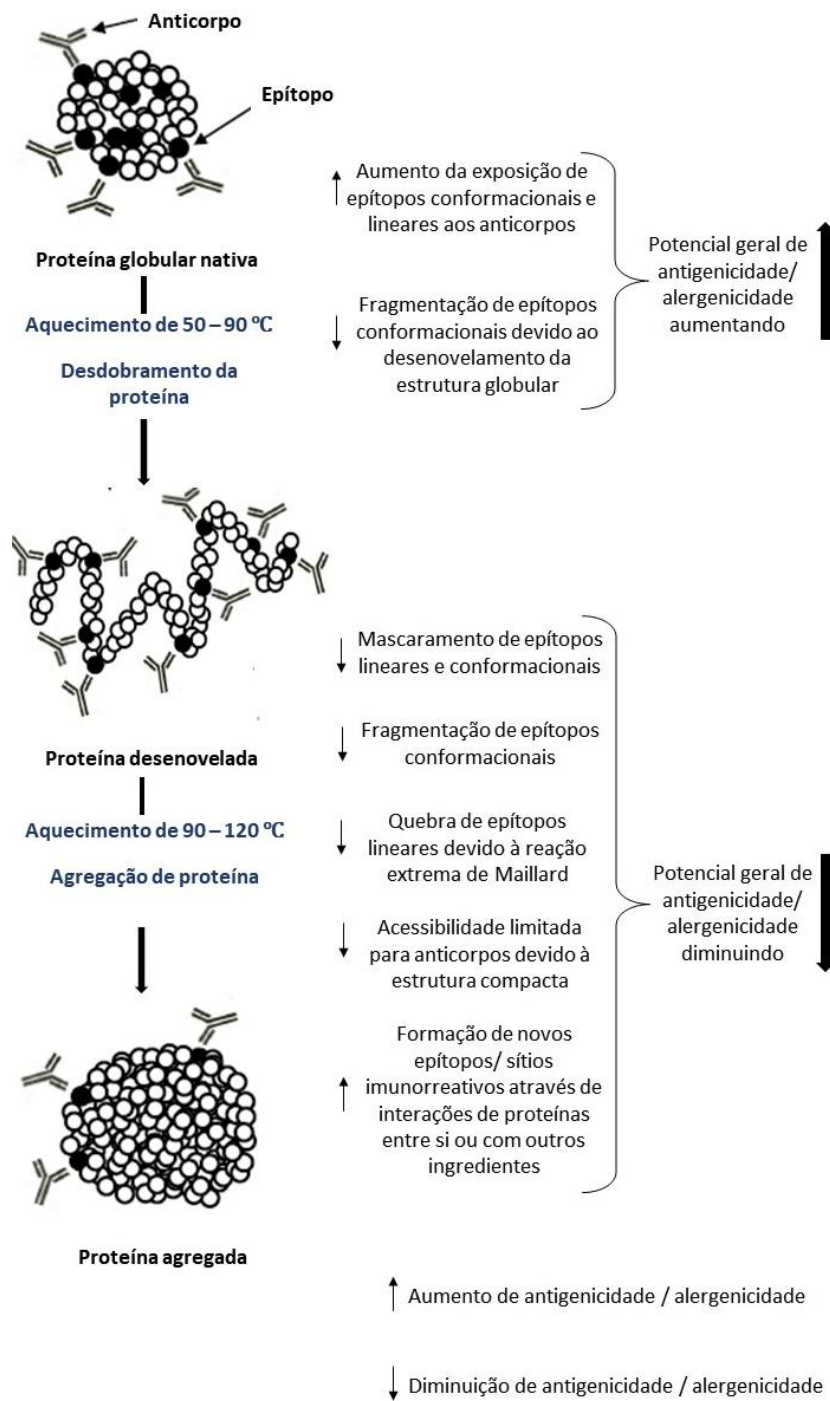


Figura 13. Esquema apresentando modificações estruturais e alterações de epítomos das principais proteínas do soro do leite durante tratamento térmico e o impacto na alergenicidade.

Adaptado de BOGAHAWATHTHA; CHANDRAPALA; VASILJEVIC, 2017.

Poucos estudos relatam o potencial alergênico e digestibilidade no leite em pó, produto gerado por tratamento térmico, concentração e desidratação por atomização. Amostras de leite submetido a *spray dryer* e leite concentrado obtiveram maior quantidade de proteínas de soro quando comparadas ao leite apenas pasteurizado (LIU *et al.*, 2020).

A homogeneização faz com que as principais proteínas sejam adsorvidas nos glóbulos de gordura diminuindo a quantidade das proteínas de membrana desses glóbulos e tornando-se mais vulneráveis à hidrólise enzimática. Quando esse processo é associado ao tratamento térmico há maior eficiência na dispersão dos ácidos graxos livres na fase entérica da digestão *in vitro* (YE *et al.*, 2017; DUPONT; TOMÉ, 2020).

A avaliação da digestão das proteínas do leite é de suma importância no que diz respeito às possíveis reações alérgicas, já que reações imediatas ocorrem no início da digestão, em até duas horas. Em geral, independente da origem das enzimas, a reatividade à imunoglobulina E decai exponencialmente ao final da fase entérica da digestão *in vitro*, isto é, as condições encontradas nessa fase intensificam a possível redução de alergenicidade conferido pelo tratamento ao qual o leite foi submetido (BENEDE *et al.*, 2014 VILLA *et al.*, 2018).

A relação dos processamentos empregados no leite, especialmente ultra alta temperatura e desidratação por atomização, com a alergenicidade e digestibilidade ainda não foi bem estabelecida, portanto são necessários mais estudos nessa temática, especialmente no processo como um todo, em que as operações unitárias são realizadas em sequência, no ambiente industrial (LIU *et al.*, 2020; VILLA *et al.*, 2018).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a digestibilidade e alergenicidade das proteínas do leite de vaca em leites comerciais processados por diferentes tecnologias.

4.2 Objetivos Específicos

- Digerir os leites em estudo pelo método de simulação da digestão humana;
- Testar a alergenicidade dos leites em estudo por ensaio imunoenzimático;
- Analisar quimicamente as proteínas dos leites digeridos.

5 METODOLOGIA

5.1 Material

Diferentes leites integrais, comercialmente disponíveis, tratados por pasteurização, ultra alta temperatura (UHT) e desidratado, ambos homogeneizados, foram selecionados. O leite

desidratado foi reconstituído segundo orientação do fabricante. Também foi utilizado leite cru de produtores locais de leite, para fins comparativos.

O desenho experimental compreende 4 replicatas experimentais, tendo sido cada uma delas analisadas em 3 replicatas técnicas (analíticas). Dessa forma, cada tipo de leite compreende um total de 12 amostras.

A fim de obter amostras mais homogêneas no que diz respeito às variações edafoclimáticas da produção leiteira, foram selecionados leites da bacia leiteira da região Sudeste do país, mais especificamente do Rio de Janeiro e de Minas Gerais, com lotes de produção nas estações outono, inverno e primavera (entre 26/05/2019 e 25/11/2019).

5.2 Métodos

A Figura 17 mostra a estratégia analítica do estudo.

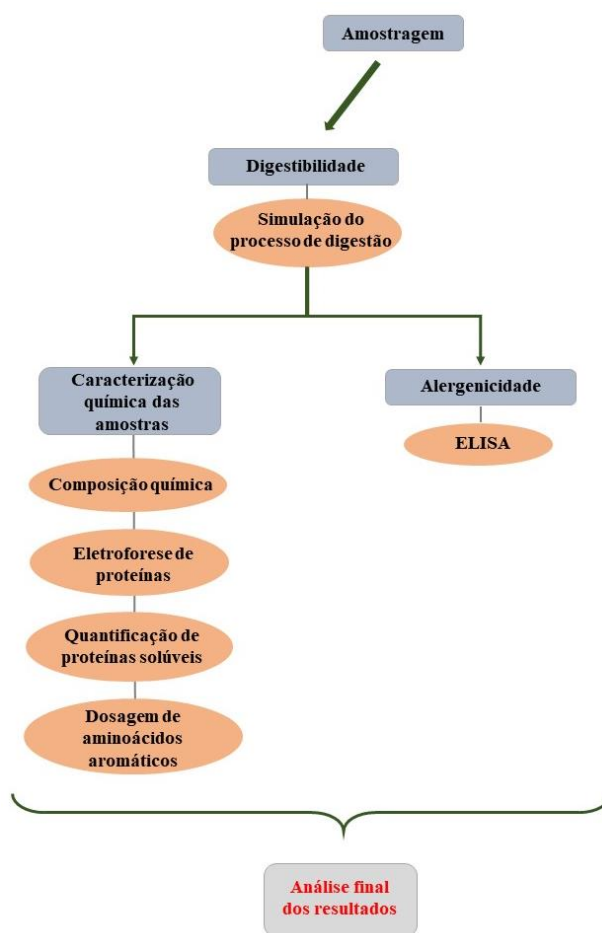


Figura 14. Fluxograma da metodologia do estudo.

5.2.1 Determinação de proteínas e gorduras dos leites crus

A determinação de proteínas e gorduras totais das amostras de leite cru foi realizada de acordo com os métodos oficiais da AOAC (2010). A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl. As amostras foram submetidas à digestão com ácido sulfúrico para que o nitrogênio das proteínas fosse transformado em sulfato de amônio, posteriormente à destilação com a finalidade de liberar a amônia e, finalmente à titulação para quantificar nitrogênio presente em cada amostra. O fator de conversão da relação entre nitrogênio e proteína utilizado foi de 6,38. A quantificação de gordura deu-se através do extrator automático (Am 5-04) de acordo com a técnica de hidrólise ácida, na qual as amostras tem sua porção lipídica extraída com solventes, evaporada e posteriormente pesada.

5.2.2 Simulação do processo de digestão

A simulação da digestão foi realizada de acordo com o consenso mundial do método de digestão estática *in vitro*, Infogest (MINEKUS, *et al.*, 2014; BRODKORB *et al.*, 2019).

Durante o processo, a fase salivar não foi realizada por se tratar de um alimento líquido, como já preconizado no método. Portanto, foi adicionado aos diferentes leites estudados o fluido gástrico simulado contendo pepsina suína (423 U.mg⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e a digestão gástrica ocorreu por 2h, sob branda agitação, a 37 °C (Banho Dubnoff, NT 232, Novatecnica, Piracicaba, SP, Brasil). Rapidamente, o pH foi ajustado para 7, a solução foi misturada ao fluido intestinal simulado contendo pancreatina suína (7,05 U.mg⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e bile de origem bovina e ovina (1,00 mmol.g⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e permaneceu em incubação por 2h, nas condições citadas anteriormente.

As amostras foram coletadas antes de serem submetidas ao processo de digestão (tempo de 0 hora), nas fases gástrica e entérica da digestão, após 2 e 4h, respectivamente e congeladas para as análises de quantificação de proteínas solúveis e aminoácidos aromáticos, eletroforeses e de alergenicidade.

5.2.3 Monitoramento da digestão *in vitro*

O monitoramento do processo de digestão foi conduzido por meio das análises de quantificação de proteínas solúveis e dosagem de aminoácidos aromáticos a fim de que as proteínas pudessem ser quantificadas em seus diferentes pesos moleculares durante a digestão, sejam como peptídeos maiores ou menores.

Quantificação de proteínas solúveis

A quantificação de proteínas solúveis foi realizada pelo método de Bradford (1976), que permite quantificar cadeias polipeptídicas com peso molecular superior a 3.000 Da, baseando-se na mudança de coloração do reagente Comassie Blue G250. As amostras foram adicionadas ao

reagente, homogêneas, e permaneceram assim por 15 minutos antes da leitura no espectrofotômetro digital SP-220 (Biospectro, Curitiba, PR, Brasil).

Para as leituras espectrofotométricas utilizou-se cubeta de vidro, lâmpada de tungstênio, curva de calibração de albumina e comprimento de onda em 595 nm. A curva de calibração foi realizada em 5 pontos, com padrões nas concentrações de 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml e 0,5 mg/ml.

Dosagem de aminoácidos aromáticos

A dosagem espectrofotométrica de aminoácidos aromáticos foi conduzida, conforme o método proposto por Goodwin e Morton (1946). Foi utilizada uma curva-padrão de tirosina e as leituras foram realizadas em 280 nm, em cubeta de quartzo, com lâmpada de deutério.

5.2.4 Eletroforese unidimensional de proteínas

A eletroforese unidimensional foi realizada por meio das técnicas desnaturante e nativa, em gel de poliacrilamida, segundo Laemmli (1970) e Monti *et al.* (2012).

Eletroforese desnaturante

Os géis de empilhamento e corrida foram preparados com soluções de acrilamida a 8% e 12%, respectivamente e as amostras foram diluídas em tampão contendo Tris-HCl 0,5M pH 6,8, glicerol, SDS a 10%, mercaptoetanol e azul de bromofenol. No gel foram aplicados também marcadores moleculares de ampla distribuição de massa molecular (Bio-Rad Laboratories, Inc, EUA). As corridas eletroforéticas ocorreram em cuba Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc, EUA), a 100 Volts por aproximadamente 2,5 horas. Após o término das corridas os géis foram fixados e corados em solução contendo ácido acético, metanol e Coomassie Brilliant Blue R 250 por 12 horas e descorados em uma solução de metanol e ácido acético.

Eletroforese nativa

Os géis de empilhamento e separação foram preparados com soluções de acrilamida a 4% e 10%, respectivamente. As amostras foram diluídas em tampão de amostra contendo tampão Tris 62,5 mM pH 6,8, glicerol a 25% e azul de bromofenol. Antes de iniciar a corrida as cubas foram preenchidas com o tampão de corrida com pH de 8,3 para que as amostras e marcadores moleculares de ampla distribuição de massa molecular (Bio-Rad Laboratories, Inc, EUA) fossem aplicados nos géis.

Assim como no método desnaturante, as corridas ocorreram em cuba Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc, EUA), a 100 Volts por aproximadamente 2,5 horas. A coloração dos géis foi realizada com solução contendo TCA, ácido acético, metanol e Coomassie Brilliant Blue R 250 durante uma hora sob agitação. Para a revelação uma solução descorante com etanol e ácido acético foi adicionada aos géis que permaneceram sob agitação.

5.2.5 Alergenicidade *in vitro* das proteínas do leite por ELISA

A alergenidade dos leites e dos produtos digeridos foi determinada por meio do imunoenensaio enzimático utilizando kits ELISA sanduíche para caseínas e β -Lg (RIDACREEN FAST Milk, R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha). A leitura da reação foi realizada em Multiskan FC (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 450 nm, cujas absorvâncias foram inseridas no software RIDA[®]SOFT Win.net (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha) para a realização do cálculo de concentração de caseínas e β -Lg.

5.2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados por one-way ANOVA e posteriormente submetidos ao teste t de Tukey utilizando o software Microsoft Excel 2019 e nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Teor de proteínas e gorduras dos Leites Estudados

As amostras de leite usadas para a realização desse estudo compreenderam leites comerciais e crus. As amostras comerciais, processadas e comercializadas de diferentes formas, apresentavam a composição centesimal na rotulagem. Já as amostras de leite cru, foram obtidas de produtores locais na bacia da região Sudeste (Rio de Janeiro) e analisadas quanto ao teor de proteína e gordura, tendo em vista que esses macronutrientes são os que mais influenciam na formação das micelas de caseína e sua conformação, de modo a observar a homogeneidade das amostras para o estudo.

Analisando os dados da Tabela 7, percebe-se que todas as amostras de leite cru e termicamente tratados, por diferentes fabricantes, da mesma bacia leiteira do país, apresentaram alto grau de similaridade, especialmente para o nutriente-chave do estudo, que são as proteínas. O teor médio de proteínas nas amostras foi de 3,2%, com variação máxima de 19%, observado em apenas uma das amostras. Para as demais, a variação máxima foi de 9%.

O conteúdo de gorduras totais também foi similar, com exceção para as amostras de leite cru. A média total observada foi de 3,3%. Esses dados demonstram que as amostras selecionadas para o estudo apresentam alta similaridade.

Tabela 7. Composição química (g/100g) das amostras de leite usadas no estudo.

Processamento / Amostra ^a	Proteínas ¹	Gordura Total ²
UHT	1	3,0
	2	3,0
	3	3,3
	4	3,3
Pasteurizado	1	3,5
	2	3,5
	3	3,0
	4	3,5
Em pó	1	3,3
	2	3,3
	3	3,3
	4	3,3
Cru	1	2,6
	2	3,2
	3	3,4
	4	3,4

^a A composição das amostras dos leites UHT, pasteurizado e em pó foram obtidas dos rótulos dos produtos, obtidos comercialmente. Os dados para as amostras de leite cru foram analisadas no estudo.

¹Método: Kjeldahl, POP LFQ 012, rev. 4. F = 6,38

²Método: 922.06 (Hidrólise ácida), 18 ed., 3ª rev. 2010, AOAC – Association of Official Analytical Chemists.

6.2 Digestão Proteica

Todos os leites estudados foram, primeiramente, submetidos à simulação de digestão humana *in vitro* por meio do consenso internacional do processo de digestão humana: INFOGEST. Para observar a eficiência da digestão proteica, as amostras, em todas as fases da digestão, foram analisadas no que diz respeito a quantidade de proteínas solúveis e de aminoácidos aromáticos (Figura 18).

Antes da digestão, os leites apresentaram, em média, 17,80 mg de proteína por mL de leite e em torno de 1 mg/ml nas fases gástrica e entérica, demonstrando que, em todas as amostras, houve intensa hidrólise já na fase gástrica da digestão. Foi observado ainda pequeno aumento da digestibilidade entre as fases gástrica e intestinal, especialmente nos leites em pó e cru, entretanto, cabe salientar que a técnica empregada apresenta limitação quanto à quantificação de peptídeos menores, que constituem maior parte dos digeridos intestinais. Em ambas as fases de digestão notou-se redução acima de 90% de proteínas com pesos moleculares a partir de 3.000 Da em todos os tipos de leite analisados.

No que diz respeito aos aminoácidos aromáticos, entre amostra não digerida e fase gástrica em todos os leites, não foi observado aumento significativo dos aminoácidos quantificados em virtude do limite de detecção do método relacionado ao peso molecular dos

peptídeos no qual esses aminoácidos são encontrados. Os leites não digeridos tinham, em média, 0,3 mg de aminoácidos aromáticos por mL de leite e os digeridos no estômago, entre 0,37 e 0,49 mg/ml. Já para os leites digeridos no intestino delgado houve diferença sigificativa do leite cru, contando com aproximadamente 0,9 mg/ml, para os leites UHT, em pó e pasteurizado, que apresentaram em torno de 1,6, 1,6 e 2,0 mg/ml de aminoácidos livres ou pequenos peptídeos, respectivamente. Tendo em vista os resultados, foi possível revelar que o aumento de digestibilidade relacionado ao fim da fase gástrica foi em torno de 1,25 vezes em todos os leites, enquanto no fim da fase entérica foi de aproximadamente 5,5 vezes nos leites UHT e pasteurizado, 4,8 vezes no leite em pó e de 2,6 vezes no leite cru.

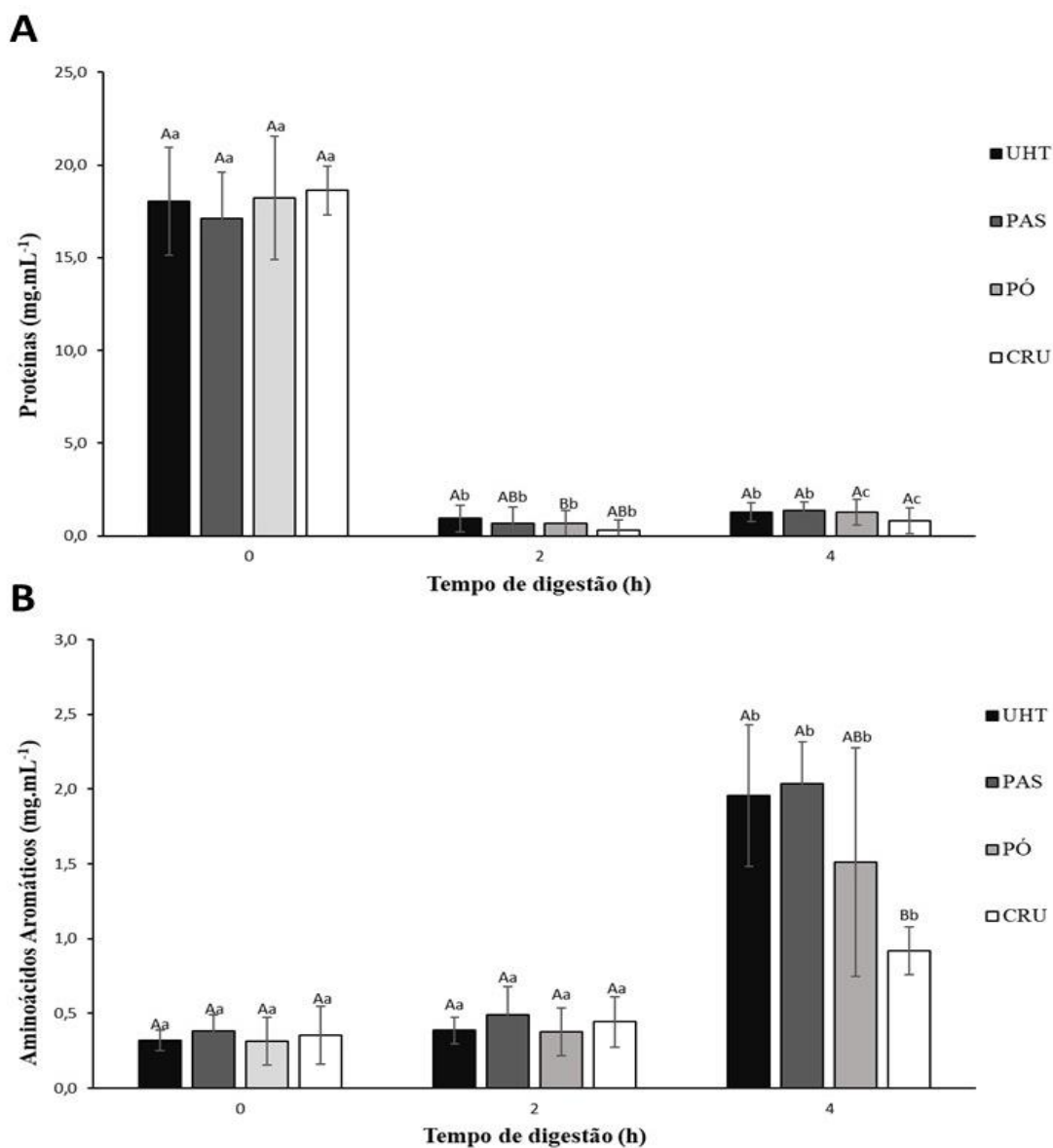


Figura 15. Quantificação de proteínas solúveis pelo método de Bradford (A) e de aminoácidos aromáticos (B) dos leites UHT, pasteurizado, em pó e cru nos estados não digerido (0h), digerido na fase gástrica (2h) e digerido na fase entérica (4h).

n = 4; p < 0,05

Letras maiúsculas diferentes: diferença significativa entre os leites no mesmo tempo de digestão.

Letras minúsculas diferentes: diferença significativa entre os tempos de digestão no mesmo tipo de leite.

Sabendo que as análises de quantificação de proteínas solúveis e de aminoácidos aromáticos são complementares quando se trata de digestibilidade, pode-se afirmar que, por meio da ação da pepsina, as proteínas foram transformadas em peptídeos de alto peso molecular e na fase intestinal da digestão, por meio da pancreatina, esses peptídeos foram enfim degradados a peptídeos menores e aminoácidos livres. Além disso, foi constatado que ao final da fase entérica, o perfil de degradação proteica foi semelhante entre os leites estudados com exceção do leite cru.

Ao utilizarem outro método de digestão *in vitro*, consistindo em 30 minutos de duração da fase gástrica e uma hora da intestinal, Wada e Lönnnerdal (2014) constataram que a digestibilidade de proteínas de leites cru, pasteurizado e UHT ficou, em média, acima de 75%. Embora estatisticamente não tenha sido apontada uma diferença significativa, uma ordem clara de maior digestibilidade é observada em função das médias, sendo UHT, pasteurizado e, por fim, o leite cru.

Kopf-Bolanz e colaboradores (2014) realizaram a simulação da digestão *in vitro* e quantificaram as proteínas ao final da digestão, que resultou em aproximadamente 0,321 mg/ml, 0,305 mg/ml e 0,302 mg/ml para os leites cru, pasteurizado e UHT, respectivamente. Diferentemente do presente estudo, não houve diferença significativa entre o teor proteico do leite cru para os demais, contudo, esse leite foi o que apresentou, aparentemente, menor susceptibilidade à digestão dentre os leites mencionados.

Sabe-se que aproximadamente 77% das caséinas do leite são degradadas antes de 30 minutos de digestão pela pepsina e após a fase entérica da digestão elas não são mais encontradas, seja *in vivo* ou *in vitro*. Portanto, como se trata das proteínas mais abundantes no leite, um alto nível de digestibilidade, como observado nesse estudo e nos trabalhos supracitados, já era esperado (BOUZERZOUR *et al.*, 2012; BARBÉ *et al.*, 2013; SANCHON *et al.*, 2018).

Por fim, apesar das diferenças entre os parâmetros físicos do processamento dos diferentes leites, os dados mostram que não houve diferença significativa para a digestão proteica dos mesmos, no entanto, observa-se uma leve tendência de resistência do leite cru à atuação das enzimas digestivas humanas. Este dado está de acordo com a literatura e pode ser justificado pela ausência de aplicação de calor ou cisalhamento, não gerando alterações conformacionais nas proteínas lácteas, deixando-as preservadas no meio em que se encontram.

6.3 Perfil Proteico por Eletroforese Desnaturante e Nativa

Após verificar que a digestão proteica foi bem sucedida, o perfil proteico de cada fase de digestão dos leites estudados foi analisado por meio de eletroforese SDS-PAGE (Figura 19), que

permite calcular, de forma semi-quantitativa, cada proteína presente no leite, nas diferentes fases da digestão, por meio do peso molecular das proteínas do padrão molecular utilizado, possibilitando a identificação. Ao observar o perfil proteico das amostras nota-se que os leites não digeridos apresentaram o mesmo perfil, contendo imunoglobulinas, lactoferrina, BSA, α -, β - e κ -caseínas, β -Lg e α -La, ou seja, as principais proteínas lácteas.

Após as duas horas que compreenderam a fase gástrica da digestão, nota-se que a β -Lg ainda não tinha sido degradada nos leites pasteurizado, cru e em pó e, sendo parcialmente degradada no leite UHT estudado. Já as demais proteínas, foram todas amplamente digeridas, uma vez que as bandas não aparecem no gel de eletroforese.

Após quatro horas que compreendeu a digestão gástrica (2h), seguida da fase entérica (2h), pode-se observar que a β -Lg já não aparece mais no gel, indicando a digestão dessa proteína no intestino. Esses dados estão de acordo com os dados observados nas quantificações colorimétricas, apresentadas na Figura 15.

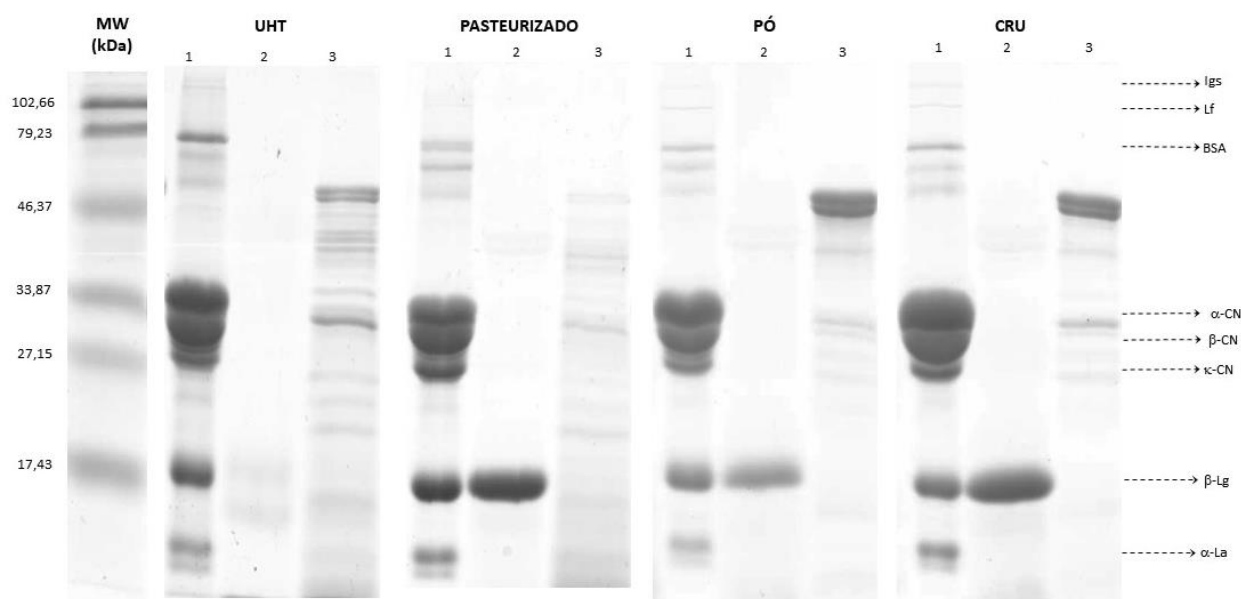


Figura 16. Eletroforese SDS-PAGE dos leites UHT, pasteurizado, em pó e cru durante a digestão.

MW: peso molecular; 1: leite não digerido; 2: leite digerido no estômago; 3: leite digerido no intestino delgado; Igs: imunoglobulinas; Lf: lactoferrina; BSA: albumina de soro bovino; α , β , κ CN: alfa, beta e capa caseína; β -Lg: beta-lactoglobulina; α -La: alfa-lactoalbumina.

O método de eletroforese é amplamente utilizado para complementar a avaliação de digestibilidade para proteínas de leite que, após a fase gástrica, comumente é vista apenas uma proteína remanescente – β -lactoglobulina –, cuja intensidade e incidência são maiores nos leites

pasteurizado, cru e em β -Lg em pó, liofilizada (BOSSIOS *et al.*, 2011; KOPF-BOLANZ *et al.*, 2014; BRODKORB *et al.*, 2019).

Nos digeridos da fase entérica foi notado o surgimento de diversas bandas que sabidamente não são originárias dos leites em questão. Tal problemática pode ser compreendida ao relacionar os dados obtidos com o estudo de Kopf-Bolanz e colaboradores (2014), trabalhando com leites UHT, pasteurizado e cru, foram também submetidos a SDS-PAGE (Anexo A) juntamente com um controle de cada fase da digestão que consistiam em: saliva e suco gástrico para a fase gástrica e saliva, suco gástrico, pancreatina e bile para a entérica. Controles de cada fase resultam em proteínas provenientes dos fluidos utilizados na digestão.

Fato também observado em cremes à base de leites cru e pasteurizado digeridos por ratos (GALLIER *et al.*, 2013), no qual as proteínas foram totalmente hidrolisadas no intestino delgado (Anexo B).

Relacionando os diferentes processamentos adotados nos leites analisados, sabe-se que as caseínas são digeridas mais rapidamente em leites termicamente tratados se comparados ao cru, fato que não foi observado nesse trabalho devido ao tempo da digestão no qual as amostras foram recolhidas. Devido à parcial desmobilização proteica causada por tratamentos térmicos houve maior exposição das porções peptídicas específicas de ligação das enzimas digestivas, tornando-as mais sensíveis à digestão ainda no início da fase gástrica (YE; ROY; SINGH, 2020).

Ye e colaboradores (2017) demonstraram que, na digestão gástrica, o leite UHT homogeneizado foi mais facilmente digerido que o pasteurizado e cru, fato também observado na eletroforese das proteínas dessa fase da digestão (Figura 18), em que a β -Lg foi quase completamente degradada no leite UHT. Lin e colaboradores (2010) observaram que as proteínas do soro foram mais degradadas em leite UHT quando comparado aos leites cru e outros pasteurizados em diferentes combinações de temperatura e tempo.

Outro fator que vem sendo estudado é a influência da homogeneização na digestão das proteínas lácteas, já que elas facilitam a interação entre os sistemas aquoso e lipídico do leite – uma vez que o leite passa a apresentar uma reorganização desses sistemas em gotículas menores – gerando mais uniformidade. Nesse contexto, β -Lg e β -CN tornam-se mais disponíveis para hidrólise pela pepsina. Quando a homogeneização e altas temperaturas são associadas no tratamento do leite, há maior agregação das proteínas e gotículas de gordura que geram mais poros no coágulo. Os poros formados, por sua vez, facilitam a entrada e conseqüentemente, a ação das enzimas digestivas (YE *et al.*, 2017; DUPONT; TOMÉ, 2020).

Considerando os dados obtidos por meio de quantificações de proteínas solúveis, aminoácidos aromáticos, perfil eletroforético além dos resultados de outras pesquisas é possível afirmar que a intensidade do tratamento UHT aliada à homogeneização é capaz de aumentar a digestibilidade das proteínas de leite de vaca, especialmente no estômago.

A fim de observar o comportamento das proteínas dos leites estudados sem desnaturá-las, realizou-se a eletroforese nativa (Figura 20) que preserva as características conformacionais das

proteínas, como grau de enovelamento, formação de multímeros e interações físico-químicas. Nos leites não digeridos os perfis eletroforéticos consistiram de, no máximo, 4 bandas, refletindo dessa forma a presença de aglomerações proteicas e, especialmente, a estrutura das micelas de caseína, como já referenciado na literatura.

Notavelmente, os perfis proteicos nativos revelaram grande similaridade entre os leites UHT e em pó, assim como pasteurizado e cru, tanto nos não digeridos como nos digeridos após a fase gástrica. Nessa etapa da digestão, uma banda difusa e de fraca intensidade foi observada no gel, referente aos leites UHT e desidratado. Em contrapartida, duas bandas bem próximas entre si e de forte intensidade foram observadas nos leites pasteurizado e cru, sendo correspondentes às variantes A e B da β -Lg (LIN *et al.*, 2010). Ao final da digestão, todos os perfis foram semelhantes, tendo em vista que a digestão foi intensa tanto para a degradação das caseínas quanto das proteínas do soro.

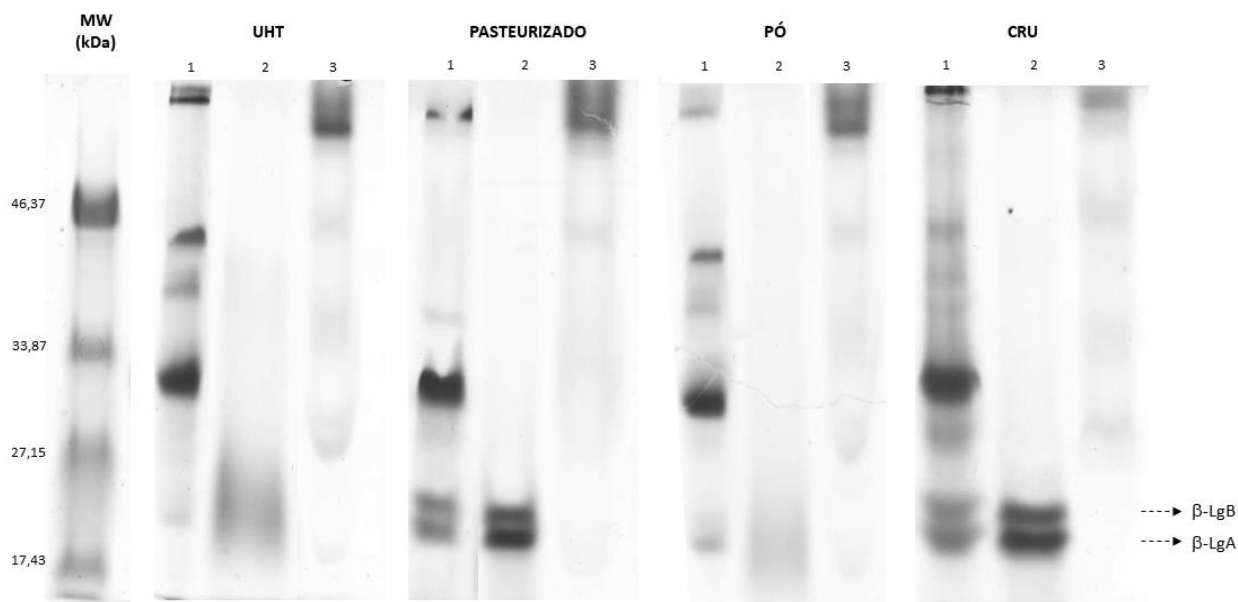


Figura 17. Eletroforese nativa dos leites UHT, pasteurizado, em pó e cru durante a digestão.

MW: peso molecular; 1: leite não digerido; 2: leite digerido no estômago; 3: leite digerido no intestino delgado; β -LgB: β -Lg variante B; β -LgA: β -Lg variante A.

Lin e colaboradores (2010) também analisaram leites pasteurizado, UHT – comercialmente disponíveis na China (Anexo C) – e cru e conduziram a eletroforese nativa para avaliar os perfis proteicos *in natura* e possíveis diferenças entre eles. Há similaridades com os dados obtidos nesse estudo no que diz respeito à presença das bandas referentes as variantes da β -Lg e na intensidade mais fraca dessas mesmas proteínas na amostra de leite UHT, corroborando também com o exposto no SDS-PAGE. Nesse trabalho publicado em 2010 também foi registrado

que, ao submeter o mesmo leite cru a tratamentos térmicos (variando a temperatura de 65 a 100 °C por 5 ou 10 minutos) a incidência das proteínas do soro, e especialmente da β -Lg, diminuiu conforme o aumento das duas variáveis estudadas (tempo e temperatura).

6.4 Alergenicidade *in vitro*

Para analisar o potencial alergênico *in vitro* dos leites de vaca em suas diferentes fases da digestão, todas as amostras foram submetidas ao ensaio imunoenzimático (Figura 21), no qual os antígenos contidos na amostra se ligam aos anticorpos específicos para caseína e β -Lg, que revestem a placa usada nos kits analíticos. Anticorpos conjugados à peroxidase são adicionados, interagem com os complexos antígeno-anticorpo previamente formados e são expostos a um cromógeno, que ao reagir com o conjugado enzimático sofre alteração colorimétrica podendo ser medido por sua absorvidade. Dessa forma, somente as proteínas ou fragmentos peptídicos que possuem seus epítomos específicos preservados ao longo do processo digestivo são reconhecidos pelas imunoglobulinas presentes do kit de ELISA, mimetizando assim a especificidade de reconhecimento que ocorre no sistema imunológico do organismo humano.

Ao analisar a concentração de caseínas e β -Lg nos leites não digeridos percebe-se que não houve diferença significativa entre eles, independente de terem sido ou não submetidos a um processamento térmico. Considerando a relação entre os leites não digeridos e após a fase gástrica, foi observada uma tendência de redução no reconhecimento imunogênico em todos os tipos de leites testados.

O reconhecimento imunoenzimático dos digeridos gástricos revelou que, comparativamente, os leites UHT e em pó – com 52 e 53% de redução respectivamente –, apresentaram maior tendência de redução da resposta alergênica quando comparados aos leites pasteurizado (7%) e cru (21%). Essa tendência, apesar de corroborar com os dados de digestão e eletroforese previamente apresentados nesse estudo, não foi comprovada estatisticamente por consequência da grande variação dos dados brutos entre os experimentos por se tratar de um teste extremamente sensível gerando respostas na grandeza de parte por milhão.

Relacionando os digeridos da fase entérica com as fases anteriores da digestão, nota-se uma redução significativa da concentração de caseínas e β -Lg reativos aos anticorpos do kit em todos os leites, ou seja, houve uma diminuição acentuada da alergenicidade *in vitro*, com redução mínima de 96% para todos os tipos de leite analisados. Adicionalmente, não foi demonstrada qualquer distinção significativa entre os leites analisados após a fase entérica da digestão, fato que se deve à destruição dos epítomos responsáveis por desencadear respostas alergênicas às caseínas e β -Lg pelo processo digestivo humano.

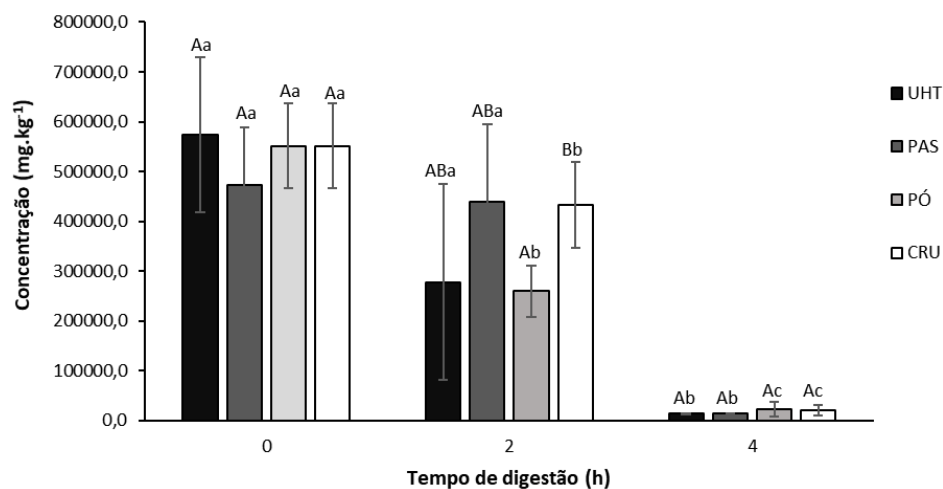


Figura 18. Alergenicidade *in vitro* à caseína e β -Lg nos leites UHT, pasteurizado, em pó e cru nos estágios não digeridos (0h), digeridos no estômago (2h) e digeridos no intestino delgado (4h).

n = 4; p < 0,05

Letras maiúsculas diferentes: diferença significativa entre os leites no mesmo tempo de digestão.

Letras minúsculas diferentes: diferença significativa entre os tempos de digestão no mesmo tipo de leite.

A sensibilidade de um indivíduo a um alérgeno alimentar é muito particular, o que justifica a falta de concordância em relação à concentração segura para ingestão de um determinado alérgeno em um alimento ou a ingestão mínima recomendada para não causar reações alérgicas. Uma vez que as respostas imunogênicas às proteínas do leite, quando mediadas por IgE, podem causar sintomas geralmente logo após a ingestão ou nas 2h seguintes, todos os tipos de leite podem gerar reações imediatas em pessoas alérgicas, uma vez que todas as amostras não digeridas apresentaram alta imunorreatividade (BROZEK *et al.*, 2012; FLOM; SICHERER, 2019).

Quando a faixa de temperatura de 50 a 90 °C é empregada no processamento de leite pode ocorrer aumento da antigenicidade das proteínas do soro possivelmente em decorrência da exposição de epítomos alérgicos antes escondidos no interior da conformação nativa das proteínas devido ao seu desenovelamento. Foi descrito em ratos (RYTKÖNEN *et al.*, 2002) que a β -Lg aquecida a 90 °C por 30 min, portanto desnaturada, intensificou a resposta imune local no trato gastrointestinal se comparada a β -Lg não tratada por calor. Em contrapartida, Ehn e colaboradores (2004) relataram diminuição significativa da capacidade de ligação entre IgE e β -Lg quando a matriz foi exposta à temperatura de 90 °C (BU *et al.*, 2013).

Estudos demonstram que leites, especialmente no que diz respeito às proteínas do soro, apresentam redução na alergenicidade quando submetidos a altas temperaturas (acima de 90 °C), fato explicado pela destruição ou inacessibilidade de epítomos anteriormente expostos na

superfície da molécula. O oposto acontece com as caseínas que praticamente não são afetadas nessa faixa de temperatura (KLEBER; HINRICHS, 2007; BU *et al.*, 2009; BU *et al.*, 2013; BOGAHAWATHTHA; CHANDRAPALA; VASILJEVIC, 2017).

Sabe-se que a caseína, mesmo submetida à processamentos com elevadas temperaturas, não tem a antigenicidade consideravelmente alterada. Em grande parte, isso se deve à maior quantidade de epítomos lineares em detrimento dos conformacionais, fenômeno que não é visto para β -Lg, que possuem ambos os tipos de epítomos (BOGAHAWATHTHA; CHANDRAPALA; VASILJEVIC, 2017; VILLA *et al.*, 2018).

Durante uma hora de fase gástrica da digestão em indivíduos adultos relata-se em torno de 95% de imunorreatividade para β -Lg e uma redução drástica de 100% a 0% para β -CN em menos de 20 minutos, devido a eficiência de sua degradação no estômago. Em 30 minutos da digestão entérica ainda se observa de 80 a 60% de residual de imunorreatividade para β -Lg enquanto a taxa para β -CN permanece nula. Também foi descrito que o processamento térmico junto com hidrólise enzimática diminui satisfatoriamente a alergenicidade ao leite (MICIŃSKI *et al.*, 2013; DUPONT; TOMÉ, 2020).

Considerando todos os resultados, pode-se observar que houve intensa degradação proteica após as fases gástrica e entérica, com destaque para menor grau de digestibilidade no leite cru ao final do processo digestivo simulado, fato corroborado pelo perfil eletroforético. Ao analisar as proteínas de forma mais específica, notou-se a presença apenas da β -Lg mesmo após 2 horas de digestão, tendo maior concentração nos leites pasteurizado e cru e menor nos leites em pó e UHT. Consequentemente, os leites com menor concentração dessa proteína apresentaram tendência de redução de alergenicidade quando comparados aos outros dois. Após o término da digestão, o perfil proteico torna-se similar em todas as amostras, assim como a redução de alergenicidade que ficou em torno de 96% para todos os leites analisados.

Cabe ressaltar que muitos estudos avaliam a resposta das proteínas em sistemas isolados e em diferentes condições de digestão. No presente estudo, em contrapartida, optou-se por observar essas mesmas respostas em leites comerciais, inclusive com a presença de gordura, que é alterada nos processos térmicos. Assim, o diferencial foi demonstrar em produtos comerciais, os comportamentos proteicos no que diz respeito à digestibilidade e alergenicidade.

7 CONCLUSÕES

Considerando os resultados referentes à digestibilidade das proteínas do leite de vaca, foi demonstrada alta resistência térmica da β -Lg permanecendo íntegra até o fim da digestão gástrica, apenas quando submetidas a temperaturas abaixo de 80 °C, como no caso da pasteurização. No entanto, ao final da digestão gastrointestinal, as proteínas de todos os leites testados foram amplamente digeridas.

Devido à ausência da β -Lg após duas horas de digestão, os leites tratados por ultra alta temperatura (UHT) e o desidratado (em pó) evidenciaram tendência de redução de alergenicidade

quando comparadas ao leite pasteurizado. Dada a alta eficiência da digestão intestinal, não houve diferença entre os leites estudados.

No contexto de países emergentes como o Brasil, ou subdesenvolvidos, são notícias animadoras, pois leites que são mais amplamente distribuídos em consequência da vida útil estendida e, em geral, com menor custo, não representam prejuízos na digestão proteica e além de não impactar negativamente o sistema imunológico, podem servir como tema de muitos estudos visando uma possível atenuação alergênica e futuras aplicações na indústria láctea.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C. C. D. et al. Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. **Enciclopédia biosfera** v. 9, n. 16, p. 15, 2013.
- ALVES, E. R. A.; SOUZA, G. da S.; ROCHA, D. de P. Lucratividade da agricultura. **Revista de Política Agrícola**, v. 21, n. 2, p. 45-63, 2012.
- ANTUNES, A.J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. Ed. Manole, Barueri, SP, p. 642, 2003.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC N° 136, DE 8 DE FEVEREIRO DE 2017**: 2 p., 2017.
- AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**, 18 ed., 3ª rev, 2010.
- ARLA FOODS. **European consumption of uht milk doubles**. Arla, 2003. Disponível em: <<https://www.arla.com/company/news-and-press/2003/pressrelease/european-consumption-of-uht-milk-doubles-760705/>>. Acesso em: 26/04/2018.
- BALDE BRANCO. **ABLV aponta crescimento do setor leiteiro**. Balde Branco, 2016. Disponível em: <<http://www.baldebranco.com.br/ablv-aponta-crescimento-do-setor-leiteiro/>>. Acesso em: 26/04/2018.
- BARBE, F. et al. The heat treatment and the gelation are strong determinants of the kinetics of milk proteins digestion and of the peripheral availability of amino acids. **Food Chem**, v. 136, n. 3-4, p. 1203-12, 2013. ISSN 1873-7072 (Electronic) 0308-8146 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23194515> >.
- BENEDE, S. et al. In vitro digestibility of bovine beta-casein with simulated and human oral and gastrointestinal fluids. Identification and IgE-reactivity of the resultant peptides. **Food Chem**, v. 143, p. 514-21, 2014. ISSN 1873-7072 (Electronic) 0308-8146 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24054275>>.
- BOGAHAWATHTHA, D.; CHANDRAPALA, J.; VASILJEVIC, T. Modulation of milk immunogenicity by thermal processing. **International Dairy Journal**, v. 69, p. 23-32, 2017. ISSN 09586946.
- BOSSIOS, A. et al. Effect of simulated gastro-duodenal digestion on the allergenic reactivity of beta-lactoglobulin. **Clinical and Translational Allergy**, v. 1, n. 6, p. 11, 9, 2011. Disponível em: <<http://www.ctajournal.com/content/1/1/6> >.
- BOUZERZOUR, K. et al. In vivo digestion of infant formula in piglets: protein digestion kinetics and release of bioactive peptides. **Br J Nutr**, v. 108, n. 12, p. 2105-14, 2012. ISSN 1475-2662 (Electronic) 0007-1145 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22377314> >.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BRASIL, R. B. et al. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal**, v. 25, n. 2, p. 10, 2015.

BRASIL. **DECRETO Nº 10.468, DE 18 DE AGOSTO DE 2020**. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO: 35 p. 2020.

BRASIL. **DECRETO Nº 9.013, DE 29 DE MARÇO DE 2017 - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**: 77 p. 2017.

BRODKORB, A. et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nat Protoc**, v. 14, n. 4, p. 991-1014, 2019. ISSN 1750-2799 (Electronic) 1750-2799 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30886367>>.

BROZEK, J. L. et al. Oral immunotherapy for IgE-mediated cow's milk allergy: a systematic review and meta-analysis. **Clin Exp Allergy**, v. 42, n. 3, p. 363-74, 2012. ISSN 1365-2222 (Electronic) 0954-7894 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22356141>>.

BU, G. et al. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. **Dairy Sci Technol**, v. 93, n. 3, p. 211-223, 2013. ISSN 1958-5586 (Print) 1958-5586 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23626868>>.

BU, G.H. et al. Effect of heat treatment on the antigenicity of bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein isolate. **Food Agric Immunol**, v. 20, p. 195–206, 2009.

CALDEIRA, F.; CUNHA, J.; FERREIRA, M. G. ALERGIA A PROTEÍNAS DE LEITE DE VACA: Um Desafio Diagnóstico. **Acta Med Port**, v. 24, n. 4, p. 6, 2011.

CHAVAN, R. S. et al. UHT Milk Processing and Effect of Plasmin Activity on Shelf Life: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 5, p. 251-268, 2011. ISSN 15414337.

CRUZ, A. et al. Processamento de produtos lácteos: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais. Rio de Janeiro: **Elsevier**, v. 3, p. 360, 2017.

DATTA, N.; DEETH, H.C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, v. 36, n. 2, p. 173-182, 2003.

DAY, L. et al. Probing the internal and external micelle structures of differently sized casein micelles from individual cow's milk by dynamic light and small-angle X-ray scattering. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 150-163, 2017. ISSN 0268005X.

DEETH, H.; BANSAL, N. Whey Proteins: An Overview. In: (Ed.). **Whey Proteins**, cap. 1, p.1-50, 2019.

DUPONT, D.; TOMÉ, D. Milk proteins: Digestion and absorption in the gastrointestinal tract. In: **Milk Proteins**, cap. 20, p.701-714, 2020.

EHN, B.M.; EKSTRAND, B.; BENGTSSON, U.; AHLSTEDT, S. Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen beta-lactoglobulin. **J Agric Food Chem**, v. 52, p.1398–1403, 2004.

EQUIPE MILKPOINT. **Embrapa: pecuária de leite espera crescer cerca de 2% em 2020**. MilkPoint, 2020. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/pecuaria-de-leite-espera-crescer-cerca-de-2-em-2020-217720/>>. Acesso em: 04/02/2020.

EQUIPE MILKPOINT. **IBGE: produção de leite cresce 1,6% em 2018 e produtividade por vaca aumenta quase 5%!**, MilkPoint, 2019. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/ibge-producao-de-leite-cresce-16-em-2018-e-productividade-por-vaca-aumenta-qua...>>. Acesso em: 04/02/2020.

EQUIPE MILKPOINT. **Setor lácteo brasileiro começa a explorar a produção de leite A2**. GIRO DE NOTÍCIAS, MilkPoint, 2017. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/setor-lacteo-brasileiro-comeca-a-explorar-a-producao-de-leite-a2108094n.aspx?r=1216622378#>>. Acesso em: 26/04/2018.

FERREIRA, C. T.; SEIDMAN, E. Food allergy: a practical update from the gastroenterological viewpoint. **J Pediatr (Rio J)**, v. 83, n. 1, p. 7-20, 2007. ISSN 0021-7557 (Print) 0021-7557 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17279290>>.

FIALHO, T. L. et al. Sugar type matters in spray drying: Homogeneous distribution in milk powder favors repulsive interactions between proteins. **Food Structure**, v. 22, p. 100-132, 2019. ISSN 22133291.

FLOM, J. D.; SICHERER, S. H. Epidemiology of Cow's Milk Allergy. **Nutrients**, v. 11, n. 5, 2019. ISSN 2072-6643 (Electronic) 2072-6643 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31083388>>.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 677-684, 2008.

GALLIER, S. et al. In vivo digestion of bovine milk fat globules: effect of processing and interfacial structural changes. II. Upper digestive tract digestion. **Food Chem**, v. 141, n. 3, p. 3215-23, 2013. ISSN 1873-7072 (Electronic) 0308-8146 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23871080>>.

GASPARIN, F. S. R.; TELES, J. M.; DE ARAÚJO, S. C. Alergia à proteína do leite de vaca versus intolerância à lactose: as diferenças e semelhanças. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 1, p. 8, 2010. ISSN 1983-1870.

GIANNETTI, A. et al. Cow's Milk Protein Allergy as a Model of Food Allergies. **Nutrients**, v. 13, n. 5, 2021. ISSN 2072-6643 (Electronic) 2072-6643 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33946553>>.

GOLKAR, A.; MILANI, J. M.; VASILJEVIC, T. Altering allergenicity of cow's milk by food processing for applications in infant formula. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 59, n. 1, p. 159-172, 2019. ISSN 1549-7852 (Electronic) 1040-8398 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29658775>>.

GOODWIN, T. W.; MORTON, R. A. The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. **Biochemistry Journal**, v. 40, p. 628-632, 1946.

GOULDING, D. A.; FOX, P. F.; O'MAHONY, J. A. Milk proteins: An overview. In: (Ed.). **Milk Proteins**, cap. 2, p.21-98, 2020.

GRAVERSEN, K. B. et al. Cow's milk allergy prevention and treatment by heat-treated whey-A study in Brown Norway rats. **Clin Exp Allergy**, v. 50, n. 6, p. 708-721, 2020. ISSN 1365-2222 (Electronic) 0954-7894 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32077177>>.

GREENWOOD, V. **Por que tomamos leite?** BBC News Brasil, 2015. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/noticias/2015/07/150707_vert_fut_leite_ml>. Acesso em: 05/02/2019.

GREENWOOD, V. **The milk that lasts for months.** Future, BBC, 2017. Disponível em: <<http://www.bbc.com/future/story/20170327-the-milk-that-lasts-forever>>. Acesso em: 26/04/2018.

JACOB, C. M. A. et al. Prognostic Factors Associated to Persistent IgE-mediated Cow's Milk Allergy (CMA). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 2, p. S179-S179, 2009. ISSN 00916749.

JUNIOR, O. A. C.; MURAD, J. C. B. Introdução – vantagens e fatores limitantes à criação de gado de leite e corte e principais raças de bovinos de leite e corte. In: EDITORA, N. (Ed.). **Animais de Grande Porte I**, 2016. p.37.

KLEBER, N.; HINRICHS, J. Antigenic response of β -lactoglobulin in thermally treated bovine skim milk and sweet whey. **Milchwissenschaft**, v. 62, p.121–124, 2007.

KOPF-BOLANZ, K. A. et al. Impact of milk processing on the generation of peptides during digestion. **International Dairy Journal**, v. 35, n. 2, p. 130-138, 2014. ISSN 09586946.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LIEM, D. G. et al. Short communication: Influence of labeling on Australian and Chinese consumers' liking of milk with short (pasteurized) and long (UHT) shelf life. **J Dairy Sci**, v. 99, n. 3, p. 1747-1754, 2016. ISSN 1525-3198 (Electronic) 0022-0302 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26805991>>.

- LIN, S. et al. Distinction of different heat-treated bovine milks by native-PAGE fingerprinting of their whey proteins. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 803-808, 2010. ISSN 03088146.
- LIU, Y. et al. Changes in bioactive milk serum proteins during milk powder processing. **Food Chem**, v. 314, p. 126177, 2020. ISSN 1873-7072 (Electronic) 0308-8146 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31954943>>.
- MACITELLI, M. R. **Alergia à proteína do leite de vaca**. 2011. 30 p. Trabalho de conclusão de curso (Residência Médica). Pediatria, Hospital do Servidor Público Municipal, São Paulo.
- MALMGREN, B. et al. Changes in proteins, physical stability and structure in directly heated UHT milk during storage at different temperatures. **International Dairy Journal**, v. 71, p. 60-75, 2017.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 51, DE 18 DE SETEMBRO DE 2002**. Diário Oficial da União: 64 p. 2002.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62, DE 29 DE DEZEMBRO DE 2011**. Diário Oficial da União: 24 p. 2011.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 76, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018**. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO: 5 p. 2018.
- MARIE-CAROLINE MICHALSKI; JANUEL., C. Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 8, p. 423-437, 2006. ISSN 09242244.
- MARTINS, P. D. C. et al. **Anuário de Leite 2021**. p. 53, 2021. Embrapa Gado de Leite, 2021.
- MARTINS, P. D. C. et al. **Anuário Leite 2019**. CORPORATIVA, T. C. Embrapa Gado de Leite, 2019.
- MATRICARDI, P. M. et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 27 Suppl 23, p. 1-250, 2016. ISSN 1399-3038 (Electronic) 0905-6157 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27288833>>.
- MICIŃSKI, J. et al. Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction. **Polish Annals of Medicine**, v. 20, n. 1, p. 69-76, 2013. ISSN 12308013.
- MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. **Food Funct**, v. 5, n. 6, p. 1113-24, 2014. ISSN 2042-650X (Electronic) 2042-6496 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24803111>>.
- MIRANDA, J. E. C. D.; FREITAS, A. F. D. **Circular Técnica 98**. Raças e tipos de cruzamentos para produção de leite. Embrapa Gado de Leite, 2009.

MONTI G., *et al.*, Tolerability of donkey's milk in 92 highly-problematic cow's milk allergic children. **J Biol Regul Homeost Agents**, v.26, p. 75–82, 2012.

MUNIR, M. T. et al. An evaluation of hyperspectral imaging for characterising milk powders. **Journal of Food Engineering**, v. 221, p. 1-10, 2018. ISSN 02608774.

NG-KWAI-HANG, K. F. **Heterogeneity, Fractionation, and Isolation**. Milk Proteins. McGill University, Montreal, QC, Canada: Elsevier: 14 p. 2011.

NOTÍCIAS, A. I. **Produtividade de leite cresce 62% em 11 anos; produção chega a 30 bilhões de litros**. Safra ES, 2019. Disponível em: <<https://www.safraes.com.br/leite/produtividade-leite-cresce-62-11-anos-producao-chega-30-bilhoes-litros>>. Acesso em: 04/02/2020.

NUORA, A. et al. Effect of homogenised and pasteurised versus native cows' milk on gastrointestinal symptoms, intestinal pressure and postprandial lipid metabolism. **International Dairy Journal**, v. 79, p. 15-23, 2018. ISSN 09586946.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, n. n. 561-562, p. 15, 2007.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos – Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre. Ed. Artmed. v. 2, 2005.

RAHAMAN, T.; VASILJEVIC, T.; RAMCHANDRAN, L. Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 24-34, 2016. ISSN 09242244.

RODRIGUES, E., et al. **Manual técnico, 37** - Qualidade do leite e derivados: Processos, processamento tecnológico e índices. Programa rio rural, 2013.

RUBEZ, J. **O Leite nos últimos 10 anos**. Leite Brasil, 2003. Disponível em: <http://www.leitebrasil.org.br/artigos/jrubez_093.htm>. Acesso em: 26/04/2018.

RYTKÖNEN J., *et al.* Effect of heat denaturation on beta lactoglobulin-induced gastrointestinal sensitization in rats: denatured β -LG induces a more intensive local immunologic response than native β -LG. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 13, p. 269–277, 2002.

SANCHON, J. et al. Protein degradation and peptide release from milk proteins in human jejunum. Comparison with in vitro gastrointestinal simulation. **Food Chem**, v. 239, p. 486-494, 2018. ISSN 1873-7072 (Electronic) 0308-8146 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28873595>>.

SANTOS, M. C.; EMÍLIO, W. **Processamento do leite**. Federação da Agricultura do Estado de São Paulo e Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (FAESP – SENAR/SP), p.67, 2006.

SGARBIERI, V. C. Impact of Bovine Milk Whey Proteins and Peptides on Gastrointestinal, Immune, and Other Systems. p. 31-55, 2017.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Braz. J. Food Technol.**, v. 8, n. 1, p. 14, 2005.

STANIC-VUCINIC, D. et al. Structural changes and allergenic properties of beta-lactoglobulin upon exposure to high-intensity ultrasound. **Mol Nutr Food Res**, v. 56, n. 12, p. 1894-905, Dec 2012. ISSN 1613-4133 (Electronic) 1613-4125 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23065770>>.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; DA SILVA, L. C. **Processamento do leite**. UFES, 2007.

VIDAL, A. M. C.; SARAN NETTO, A. **Obtenção e processamento do leite e derivados**. 2018.

VILELA, D. et al. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista de Política Agrícola**. Ano XXVI: 20 p. 2017.

VILLA, C. et al. Bovine Milk Allergens: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 1, p. 137-164, 2018. ISSN 15414337.

WADA, Y.; LONNERDAL, B. Effects of different industrial heating processes of milk on site-specific protein modifications and their relationship to in vitro and in vivo digestibility. **J Agric Food Chem**, v. 62, n. 18, p. 4175-85, 2014. ISSN 1520-5118 (Electronic) 0021-8561 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24720734>>.

YE, A. et al. Effect of homogenization and heat treatment on the behavior of protein and fat globules during gastric digestion of milk. **J Dairy Sci**, v. 100, n. 1, p. 36-47, 2017. ISSN 1525-3198 (Electronic) 0022-0302 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27837978>>.

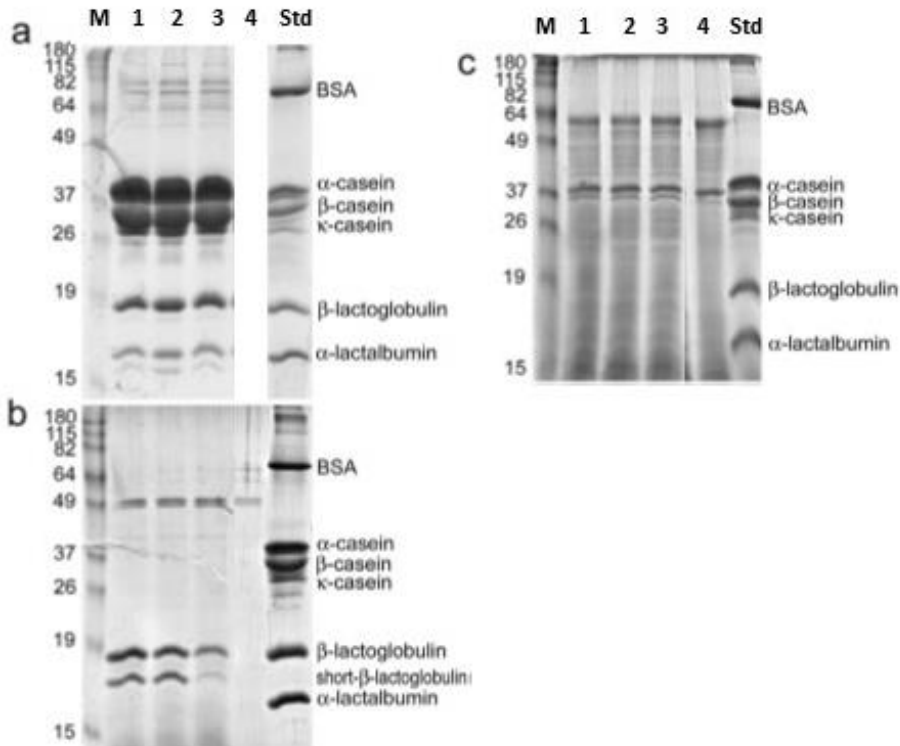
YE, A.; ROY, D.; SINGH, H. Structural changes to milk protein products during gastrointestinal digestion. **Milk Proteins**, p. 671-700, 2020.

ZOCCAL, R. **Alguns números do leite**. Balde Branco, 2016. Disponível em: <<http://www.baldebranco.com.br/alguns-numeros-do-leite/>>. Acesso em: 11/04/2018.

ZOUARI, A. et al. Microstructure and chemical composition of camel and cow milk powders' surface. **Lwt**, v. 117, p. 108693, 2020. ISSN 00236438.

ANEXOS

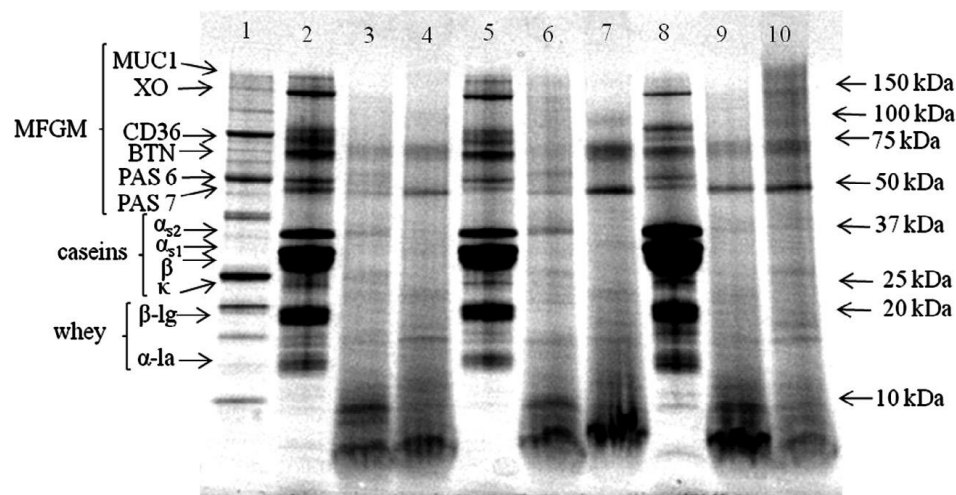
ANEXO A – SDS- PAGE dos leites pasteurizado, UHT e cru não digeridos e digeridos do estudo de Kopf-Bolanz e colaboradores (2014).



SDS-PAGE de diferentes leites por Kopf-Bolanz e colaboradores: (a) não digeridos; (b) após a fase gástrica; (c) depois da digestão completa. M: marcador molecular; 1: leite cru; 2: pasteurizado integral; 3: UHT integral; 4: controle; Std: padrão da respectiva fase.

Adaptado de KOPF-BOLANZ *et al.*, 2014.

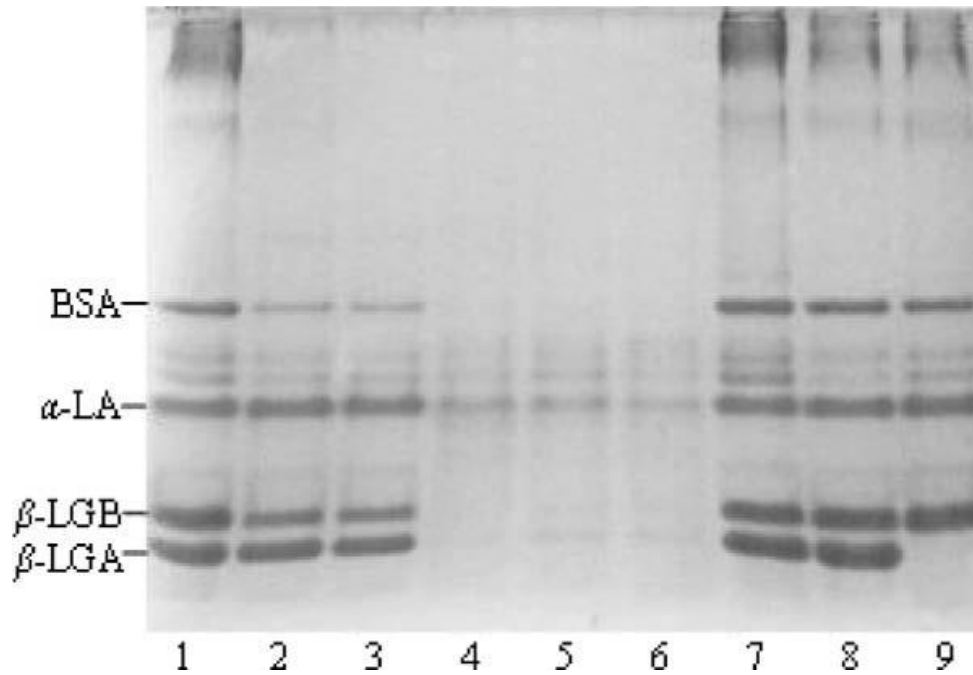
ANEXO B – Eletroforese desnaturante de proteínas de cremes à base de leites cru e pasteurizado digeridos por ratos (GALLIER *et al.*, 2013).



SDS-PAGE de creme preparado a partir de leites cru (RC), pasteurizado (PC) e pasteurizado e homogeneizado (PHC) e digerido intestinal de ratos após receberem, cada um, uma das preparações de creme (GALLIER *et al.*, 2013).

1: padrões de proteínas; 2: RC (leite cru); 3: conteúdo do intestino delgado superior dos ratos que receberam RC; 4: conteúdo do intestino delgado menor dos ratos que receberam RC; 5: PC (leite pasteurizado); 6: conteúdo do intestino delgado superior dos ratos que receberam PC; 7: conteúdo do intestino delgado menor dos ratos que receberam PC; 8: PHC (leite pasteurizado e homogeneizado); 9: conteúdo do intestino delgado superior dos ratos que receberam PHC; 10: conteúdo do intestino delgado inferior dos ratos que receberam PHC. MFGM: membrana de glóbulos gordurosos do leite, MUC1: mucina 1; XO: xantina oxidase; PAS: ácido periódico Schiff; CD36: agrupamento de diferenciação 36; BTN: butirofilina.

ANEXO C – Eletroforese nativa de proteínas do soro de leites cru, pasteurizado e UHT (Lin *et al.*, 2010).



PAGE nativo de proteínas de soro de leite cru, cinco leites bovinos comerciais e três individuais.

1: leite bovino cru como controle; 2-3: dois leites bovinos pasteurizados comerciais; 4-6: três leites bovinos UHT comerciais; 7-9: três leites bovinos individuais.

EVALUATION OF BOVINE MILK PROCESSING ON THE DIGESTIBILITY AND ALLERGENICITY OF MILK PROTEINS

Iva Paula F. dos Santos¹; Luísa Ozorio²; Tatiana L. Azevedo³; Lourdes M. C. Cabral³;

Caroline Mellinger-Silva^{3*}

¹ *Dept. of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil, 23890-000*

² *University of Vassouras, Vassouras, RJ, Brazil, 27700-000*

³ *Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 23020-470*

*Corresponding author: *caroline.mellinger@embrapa.br*

Article history:

Complete by editor

Keywords:

Cow's milk;

Cow's milk protein allergy;

Pasteurization;

UHT process;

Raw milk.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate whether thermal processes applied in milk, such as pasteurization and UHT affect the protein digestibility leading to changes in the allergenic responses. Samples were subjected to a simulation of the human digestion and subsequently evaluated regarding protein cleavages and enzyme immunoassay for caseins and β -lactoglobulin immunogenicity. Among the different samples, protein digestibility was mainly affected in the gastric phase. α -lactalbumin and caseins showed high susceptibility to gastrointestinal enzymes, while a partial β -lactoglobulin resistance to pepsin was observed. Concerning *in vitro* allergenicity, a tendency of reduction was demonstrated in UHT and powdered milk samples after digestion in the stomach. Following the intestinal digestion, all milk samples presented low allergenicity, over 96% reduction of antibody binding. These data corroborates to the understanding of the effects of the world's most used heat treatments in cow's milk protein digestibility and allergenicity.

1. Introduction

Bovine milk is an important source of proteins, lactose, calcium, vitamins and bioactive peptides (Villa *et al.*, 2018). In Western diets cow's milk consumption is also a habit among humans and its regular intake is associated with the prevention of several chronic diseases, including cardiovascular, diabetes, obesity and osteoporosis (Willett and Ludwig 2020). Despite its nutritional relevance and its whole on health preservation, bovine milk is on the list of the eight most allergenic foods (FAO and WHO, 2018). Currently, several allergenic epitopes have already been identified within the structure of the main milk proteins – caseins, alpha lactalbumin (α -La), beta-lactoglobulin (β -Lg). Cow's milk allergy affects 4% of children and 0.5% of adults worldwide, causing symptoms such as atopic dermatitis, acute urticaria, rhinitis, asthma exacerbation, vomiting, diarrhea and abdominal pain (Villa *et al.*, 2018, Willett and Ludwig, 2020). It is known that some food processes, including pasteurization and UHT process can modify the structure of proteins, either by glycosylation, Maillard reaction, aggregation or unfolding. These processes may alter the allergenic epitopes of proteins, influencing their binding to immunoglobulins, consequently modulating the immunological response (Bogahawaththa *et al.*, 2017, Bu *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2018). Different thermal processes such as pasteurization, ultra-high temperature (UHT) and UHT followed by atomization (milk powder) are used by milk industries to reduce microbiological contamination. However, the relation between these processes, especially UHT and atomization, with milk protein allergenicity and digestibility is not fully understood,

requiring further investigation (Bogahawaththa *et al.*, 2017, Bu *et al.*, 2013, Villa *et al.*, 2018). Milk caseins are stable proteins when milk is treated by thermal processing, which generates a small attenuation of allergenicity and a slight increase in its digestibility. In contrast, the main whey proteins (α -La and β -Lg) are more susceptible to heat, especially when temperatures over 90 °C are applied as conformational changes leads to epitopes exposition and further destruction by the gastrointestinal enzymes (Rahaman *et al.*, 2016, Villa *et al.*, 2018). During protein digestion several chemical and enzymatic reactions occur, generating changes in the structure of proteins, which can either lower or increase their allergenicity. Not all proteins are fully cleaved in amino acids during digestion. Some of them are cleaved into larger peptides preserving allergenic epitopes, which may intensify certain immune system stimulations, such as IgE binding (Benede *et al.*, 2014, Villa *et al.*, 2018). Considering all mentioned above, the present study aimed to investigate different types of bovine milk processing – pasteurized, UHT and powdered (UHT followed by spray-drying atomization) – regarding the digestibility and allergenicity of milk proteins.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Different commercially bovine milk, processed by pasteurization, UHT associated with homogenization and powder were selected. Samples of raw milk from local milk producers were also used for comparative purposes. The milk samples were selected from the dairy basin in the

Southeast of Brazil, more specifically from Rio de Janeiro and Minas Gerais.

2.2. *In vitro* gastrointestinal digestion of milk samples

Digestion simulation was carried out in accordance to the international consensus on static *in vitro* digestion, Infogest (Brodkorb *et al.*, 2019, Minekus *et al.*, 2014). As recommended by the method for liquid foods, the salivary phase of the digestion was not performed. Therefore, simulated gastric fluid containing porcine pepsin (423 U.mg⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to the different milk samples. Gastric digestion occurred for 2 hours in a water bath (Banho Dubnoff NT 232, Novatecnica, Piracicaba, SP, Brazil) under constant agitation. To stop the reaction, the pH was adjusted to 7 with hydrochloric acid. Following to the intestinal phase, the solution was mixed with a simulated intestinal fluid containing porcine pancreatin (7.05 U.mg⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and bile (1.00 mmol.g⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The reaction occurred for 2 hours and it was stopped with ice bath. Samples were kept at -20°C until further analysis.

2.3. Degree of hydrolysis

The soluble protein content was quantified according to Bradford (1976), in a digital spectrophotometer SP-220 (Biospectro, Curitiba, PR, Brazil). The spectrophotometric measurement of aromatic amino acids was carried out according Goodwin and Morton (1946). A tyrosine standard curve was used and samples were read at 280nm. Results were analyzed by one-way ANOVA and submitted to the Tukey t-test in Microsoft Excel 2019 software with a significance level of $p = 0.05$.

2.4. Protein electrophoresis

One-dimensional protein electrophoresis was performed (Laemmli, 1970) using polyacrylamide gel. The stacking and running gels were prepared with 8% and 12% acrylamide solutions, respectively. Undigested and digested milk samples, as well as a wide molecular weight standard (Bio-Rad Laboratories, Inc, United States) were applied to the gels. The electrophoretic run was carried out in the Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc, United States) at 100V for 2.5 hours. After running, the electrophoretic gels were fixed and stained in a solution containing acetic acid (10%), methanol (40%) and Coomassie Brilliant Blue R 250 (1%) overnight.

2.5. Allergenicity of Milk Proteins

The allergenicity of milk samples and their digested products was determined by enzymatic immunoassay using sandwich ELISA kits for caseins and β -Lg (RIDACREEN FAST Milk, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). The reaction was read in Multiskan FC (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) at a wavelength of 450 nm. Casein and β -Lg concentrations were calculated by the RIDA®SOFT Win.net software (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). The results correspond to the average of 4 experiments that were submitted to statistical analysis using Tukey's t-test in Microsoft Excel 2019 software with a significance level of $p = 0.05$ to compare the results.

3. Results and discussions

3.1. Milk Proteins Hydrolysis

Protein digestion began in the stomach by the activity of pepsin under acidic pH conditions. Pancreatic and intestinal proteases followed the digestion process,

hydrolyzing the remaining protein fragments (Sah *et al.*, 2016). In the present study, the soluble protein content dramatically reduced after the simulated gastric digestion achieving reductions of 24.3-, 19.5-, 25.7- and 27.3-times fold for raw, UHT, pasteurized and powdered samples, respectively (Figure 1A). After enteric digestion the soluble protein content of all bovine milk samples remained stable as the method is able to quantify proteins and peptides with molecular weight higher than 3 kDa. In contrast, no significant increase in the concentration of aromatic amino acids was observed from the undigested to gastric digested samples, showing that the peptic digestion was able to convert part of the protein into higher molecular weight peptides. Meanwhile, intestinal enzymes were able to release small peptides and amino acids and increments of 2.6-, 6.1-, 5.3- and 4.8-times fold for raw, UHT, pasteurized, and powdered milk samples, respectively, were observed after enteric digestion (Figure 1B).

3.2. Electrophoretic Profile

The Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (Figure 2) revealed that all cow's milk samples presented similar protein profiles, indicating that the different thermal processes applied did not affect their protein composition. According to Bouzerzour *et al.* (2012), approximately 77% of milk caseins are degraded before 30 minutes of digestion by pepsin and after the enteric phase of digestion they could no longer be found. Corroborating with this statement, in the present study the electrophoretic profile showed an intense reduction in casein bands for all milk samples after the gastric phase of digestion. Regarding whey proteins, the

second most abundant protein in whey (α -La) was rapidly hydrolyzed by pepsin after the simulated gastric digestion for all milk treatments. Kopf-Bolanz *et al.* (2014) found similar results for raw, pasteurized and UHT whole milk and Mellinger-Silva *et al.* (2015) in pepsin hydrolysates of whey protein isolate. The susceptibility of α -La to pepsin can be attributed to conformational alterations occurred in α -La structure at low pH, exposing its hydrophobic interior and increasing its proteolysis by pepsin (Kamau *et al.*, 2010, Nik *et al.*, 2010). The major whey protein (β -Lg) presents a strong globular conformation at low pH, hiding pepsin's target amino acids (Ozorio *et al.*, 2020). Bateman *et al.* (2010) and Ozorio *et al.* (2020) also reported a β -Lg resistance to simulated gastric digestion. In Figure 2 is possible to observe that in milk types treated with severe heat – UHT and powder – β -Lg was susceptible to pepsin, which is probably related to the thermal sensitivity of the β -Lg structure to high temperatures (Villa *et al.*, 2018), exposing pepsin target sites. However, in milk samples that received mild or no heat treatment – pasteurized and raw milk, respectively – β -Lg was further hydrolyzed by intestinal enzymes. The susceptibility of β -Lg to enteric digestion can be associated to conformational alterations at pH above 7, uncovering amino acid residues that are sensitive to intestinal enzymes (Ozorio *et al.*, 2020).

3.3. Allergenicity of caseins and β -Lg

The sensitivity of an individual to a food allergen is very particular, explaining the lack of agreement regarding safe concentration for ingestion or minimum intake recommended to avoid allergic reactions (Villa *et al.*, 2018). Figure 3 shows that prior in vitro digestion, all milk samples

presented similar immunoreactivities to casein and β -Lg through ELISA tests. If IgE-mediated responses to milk proteins may cause symptoms usually right after ingestion or within the following 2h (Villa *et al.*, 2018), all types of milk may generate immediate reactions in allergic people, since undigested samples presented high immunoreactivity. After gastric digestion, milk powder achieved the lowest allergenicity, followed by UHT, while pasteurized and raw milk showed similar profiles. Once β -Lg was completely and partially hydrolyzed in UHT and powdered milk (Figure 2), respectively, the most prominent reduction in the allergenicity of these both milk types may be related to a combination of severe heat treatment with pepsin digestion, as reported by Rahaman *et al.* (2016) and Villa *et al.* (2018). When compared to the intestinal digested, milk gastric digested samples presented higher allergenicity, which may be attributed to the preservation of allergenic epitopes in proteins and polypeptides not digested in this phase. Although in the present study the combination of alkali pH and intestinal enzymes had been able to drastically reduce the allergenicity in all cow's milk samples, some non-IgE-mediated allergic late reactions may still occur (Villa *et al.*, 2018).

4. Conclusions

Considering the results presented, undigested and in vitro digested milk samples evaluated showed similar degrees of hydrolysis. Through the electrophoretic gel it was possible to confirm the high susceptibility of cow's milk caseins to gastrointestinal digestion. The β -Lg of bovine milk types treated with intense heat (UHT and powder) showed more sensitivity

to pepsin digestion than in raw and pasteurized ones. This can also be related to the tendential lower allergenicity of both UHT and powder milk gastric digests in comparison to pasteurized and raw gastric samples. Enteric enzymes could hydrolyze the remaining proteins in all intestinal digested milk samples, which can be related to the small allergenicity observed for them. In this sense, the different thermal processes applied by industries to allow milk distribution worldwide besides providing a safe product, regarding microbiological contamination, also demonstrated small influence on the digestibility and allergenicity of the main milk proteins.

5. References

- Bateman, L., Ye, A. & Singh, H. (2010). In vitro digestion of beta-lactoglobulin fibrils formed by heat treatment at low pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9800-8.
- Benede, S., et al. (2014). In vitro digestibility of bovine beta-casein with simulated and human oral and gastrointestinal fluids. Identification and IgE-reactivity of the resultant peptides. *Food Chemistry*, 143, 514-21.
- Bogahawaththa, D., Chandrapala, J. & Vasiljevic, T. (2017). Modulation of milk immunogenicity by thermal processing. *International Dairy Journal*, 69, 23-32.
- Bouzerzour, K., et al. (2012). In vivo digestion of infant formula in piglets: protein digestion kinetics and release of bioactive peptides. *British Journal of Nutrition*, 108, 2105-14.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of

- microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248 – 254.
- Brodkorb, A., et al. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14, 991-1014.
- Bu, G., Luo, Y., Chen, F., Liu, K. & Zhu, T. (2013). Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Science & Technology*, 93, 211-223.
- Dupont, D. & Tomé, D. (2020). Milk proteins: Digestion and absorption in the gastrointestinal tract. In: *Milk Proteins*. Pp. 701-714.
- FAO & WHO (2018). Proposed draft code of practice on food allergen management for food business operators. *Codex Alimentarius Commission*.
- Goodwin, T. W.; Morton, R. A. (1946). The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Biochemistry Journal*, v. 40, p. 628-632.
- Kamau, S. M., et al. (2010). Alpha-Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 197-212.
- Kopf-Bolanz, K. A., et al. (2014). Impact of milk processing on the generation of peptides during digestion. *International Dairy Journal*, 35, 130-138.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227, 680-685.
- Mellinger-Silva, C., et al. (2015). Dual function peptides from pepsin hydrolysates of whey protein isolate. *International Dairy Journal*, 48, 73-79.
- Minekus, M., et al. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 5, 1113-24.
- Nik, A. M., Wright, A. J. & Corredig, M. (2010). Surface adsorption alters the susceptibility of whey proteins to pepsin-digestion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 344, 372-81.
- Ozorio, L., et al. (2020). Gastrointestinal digestion enhances the endothelium-dependent vasodilation of a whey hydrolysate in rat aortic rings. *Food Research International*, 133, 109188
- Rahaman, T., Vasiljevic, T. & Ramchandran, L. (2016). Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 24-34.
- Sah, B. N. P., McAinch, A. J. & Vasiljevic, T. (2016). Modulation of bovine whey protein digestion in gastrointestinal tract: A comprehensive review. *International Dairy Journal*, 62, 10-18.
- Villa, C., Costa, J., Oliveira, M. B. P. P. & Mafra, I. (2018). Bovine Milk Allergens: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 137-164.
- Willett, W. C. & Ludwig, D. S. (2020). Milk and Health. *New England Journal of Medicine*, 382, 644-654.

Acknowledgment

This work was supported by CAPES (Coordination of Higher Education Foundation) and Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation). The authors also thank R-Biopharm for the technical support to ELISA assay.

Figure 1. Soluble protein content (A) and aromatic amino acids (B) quantification of UHT, pasteurized (PAS), powdered (PO) and raw undigested and *in vitro* digested milk samples. Capital letters: significant difference between milk samples at the same time of digestion, $p < 0.05$; Lower-case letters: significant difference between digestion times in the same type of milk, $p < 0.05$.

Figure 2. SDS-PAGE electrophoretic gel of UHT, pasteurized (PAS), powdered (PO) and raw milk during simulated digestion. MW: molecular weight; 1: undigested; 2: Figure 1.

digested in the stomach; 3: digested in the small intestine; Igs: immunoglobulins; Lf: lactoferrin; BSA: bovine serum albumin.

Figure 3. Concentration of casein and β -Lg in undigested and *in vitro* digested milk samples as an indicative of milk allergenicity. PAS – pasteurized milk; PO – powdered milk. Different capital letters: significant difference between milk samples at the same time of digestion; $p < 0.05$ Different lower-case letters: significant difference between digestion times in the same type of milk; $p < 0.05$.

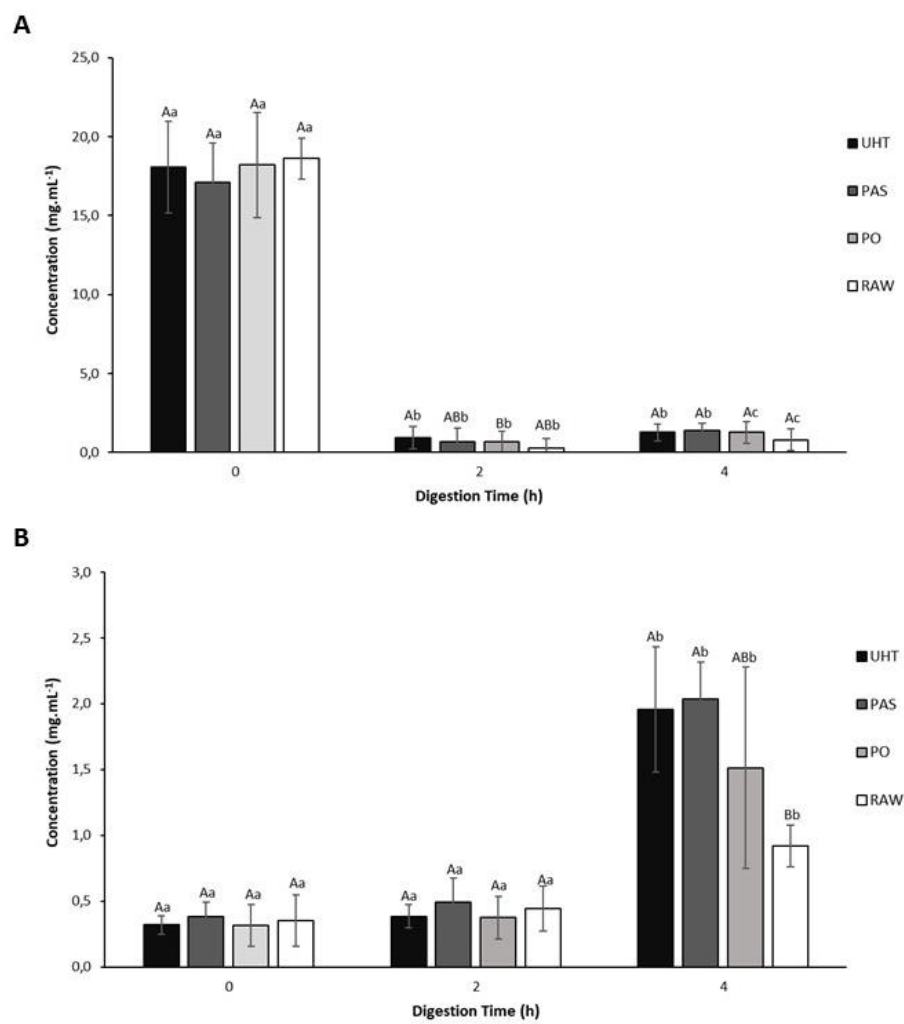


Figure 2.

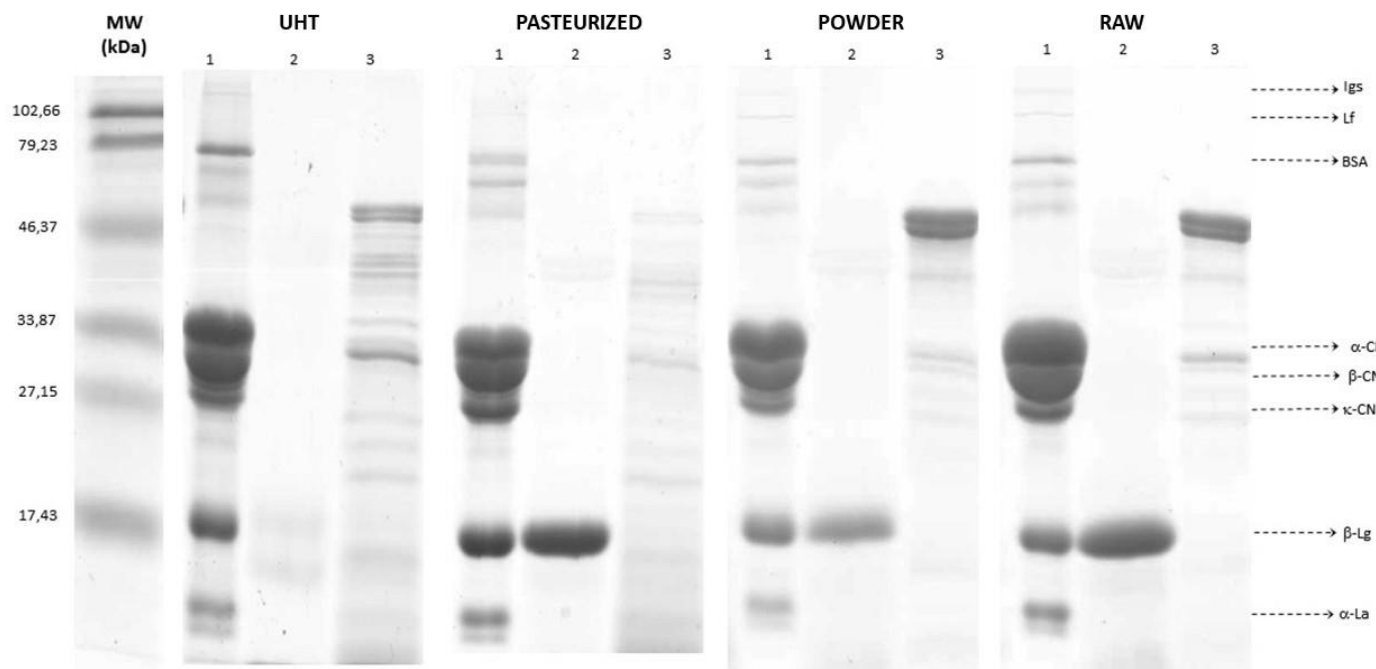


Figure 3.

