

MARCO ANTONIO MOREIRA FURTADO

DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE SORO ADICIONADO AO LEITE PASTEURIZADO

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Pós-Graduação
em Ciência dos Alimentos, para obtenção
do grau de "MESTRE".



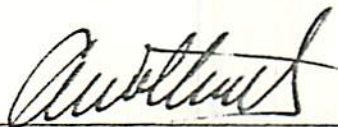
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS — MINAS GERAIS

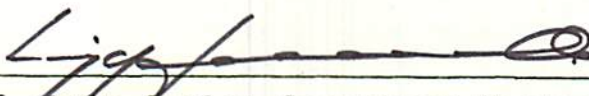
1989

DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MÉTODO ANALÍTICO PARA A
DETERMINAÇÃO DE SORO ADICIONADO AO LEITE PASTEURIZADO

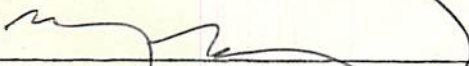
APROVADA:



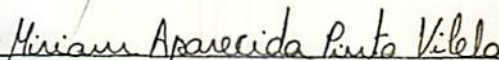
Prof. Alan Frederick Wolfschoon-Pombo; PhD
Orientador



Prof. Luiz Carlos Gonçalves Costa; MS
Examinador



Prof. Múcio Mansur Furtado; PhD.
Examinador



Profª. Miriam Aparecida Pinto Vilela; MS
Examinadora

Aos meus pais, Zequinha e
Marisa, exemplos de amor
ã vida e ao magistério

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Juiz de Fora, através do Programa CAPES/PICD, pela oportunidade dos estudos.

À Escola Superior de Agricultura de Lavras, pela acolhida e ensinamentos.

Ao Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", pelos recursos técnicos concedidos na fase experimental deste trabalho.

Ao Dr. Alan Frederick Wolfschoon-Pombo, que mesmo distante soube transmitir confiança, amizade, estímulo e orientação, elementos fundamentais para a conclusão do trabalho.

Ao Prof. Luiz Carlos Gonçalves Costa, pela amizade, permanente estímulo e apoio incondicional em todas ocasiões.

Aos Professores Múcio Mansur Furtado e Míriam Aparecida Pinto Vilela, pelas valiosas sugestões apresentadas.

Aos voluntários Marta, Ewalde, Telma, Ana, André e todos que colaboraram no trabalho experimental.

Ao amigo Prof. Paulo Henrique Fonseca da Silva pelo apoio e avaliação crítica na redação do trabalho.

Ao Dr. Rui da Silva Verneque, do Setor de Informática da EMBRAPA, pelo apoio e atenção.

À minha noiva Luciana, pelo amor, ajuda e compreensão durante este trabalho.

Enfim, à todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

BIOGRAFIA DO AUTOR

MARCO ANTONIO MOREIRA FURTADO, filho de José Furtado Pereira e Marisa Moreira Pereira, nasceu em Juiz de Fora, Minas Gerais, em 8 de março de 1961.

Em 1978 formou-se Técnico em Laticínios pelo Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", onde passou a lecionar no ano seguinte.

Concluiu o curso superior de Farmácia e Bioquímica na Universidade Federal de Juiz de Fora em 1982 onde, após concurso público, passou também a lecionar exercendo sempre o magistério na área laboratorial de análise de alimentos, especialmente em leite e derivados.

Na Faculdade de Farmácia e Bioquímica foi Vice-Diretor no período de janeiro de 1986 a junho de 1989, quando assumiu sua direção até janeiro de 1990.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. Métodos para Detecção de Soro de Queijo Adiciona- do ao leite	6
2.1.1. Método baseado nos teores de cistina e cis- teína	7
2.1.2. Método baseado em observação microscópica em luz polarizada.....	8
2.1.3. Método de dosagem do ácido siálico livre..	9
2.1.4. Métodos baseados na determinação de glico- macropeptídeo	12
2.1.5. Métodos crioscópico	14
2.1.6. Métodos baseados na determinação de amino- ácidos	15
2.2. A Importância da Fração Nitrogenada no Reconheci- mento da Fraude	15
2.3. O Nitrogênio e as Proteínas do Leite	18
2.3.1. As caseínas	22
2.3.2. As soroproteínas	26

	Página
2.3.3. Proteínas associadas à membrana do glóbulo de gordura	31
2.4. Fatores que Afetam o Teor de Proteínas do Leite..	32
2.5. Efeitos da Pasteurização sobre as Proteínas do Leite	35
2.6. Biossíntese e Secreção das Proteínas do Leite....	38
2.7. A Fosforilação das Caseínas	43
2.8. A Distribuição do Fósforo	46
3. MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1. Amostras	50
3.2. Prê-tratamento das Amostras	50
3.3. Análises	51
3.4. Métodos	51
3.4.1. Fósforo	51
3.4.2. Nitrogênio	53
3.4.3. Crioscopia e Extrato Seco	55
3.5. Curva Padrão	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. Distribuição do Fósforo e Nitrogênio no Leite Pasteurizado (desnatado)	56
4.2. Distribuição do Fósforo e Nitrogênio no Soro de Queijo	61
4.3. Resultados das Análises de Leite em Pó Desnatado e Leite Cru	67
4.4. Curva Padrão	72

	Página
4.5. Análise de Amostras de Leite Pasteurizado do Mercado Local	76
4.6. Acompanhamento do Extrato Seco e Crioscopia das Amostras	78
5. CONCLUSÕES	82
6. RESUMO	83
7. SUMMARY	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Concentração das proteínas no leite (adaptada) WALSTRA & JENNESS (59)	20
2. Propriedades de algumas proteínas do leite (adaptada) WALSTRA & JENNESS (59)	21
3. Componentes da fração NPN do leite. WOLFSCHOON-POMBO (66)	23
4. Nomenclatura dos fragmentos provenientes da β -caseína (adaptada). WALSTRA & JENNESS (59)	27
5. Concentração de imunoglobulinas no soro sanguíneo bovino, colostro e leite. WALSTRA & JENNESS (59)	30
6. Frequências das variantes genéticas de proteínas presentes no leite de diferentes raças. (adaptada) KARMAN & VAN BOEKEL (28)	34
7. Distribuição do nitrogênio no leite cru, pasteurizado e fervido. WOLFSCHOON-POMBO et alii (74).	39
8. Distribuição aproximada de fósforo no leite	48
9. Conteúdo (mg/100 ml) de fósforo e nitrogênio no leite pasteurizado	57

Tabela	Página
10 Distribuição aproximada de fósforo no leite WHITE & DAVIES (64); DAVIES & WHITE (16); BRUNNER (7); WALSTRA & JENNESS (59); MARIANI (35); HOLT et alii (26); DALGLEISH et alii (15)	60
11 Conteúdo (mg/100 ml) de fósforo e nitrogênio no soro de queijo	62
12 Conteúdo médio de fósforo (da literatura) de soro de queijo	63
13 Conteúdo médio de nitrogênio (da literatura) de soro de queijo	66
14 Correlação entre o nº de caseína e a % de soro em misturas de leite pasteurizado e soro de queijo..	72
15 Resultados das análises de misturas laboratoriais de leite pasteurizado e soro de queijo.....	77
16 Resultado das análises de leite pasteurizado da Região de Juiz de Fora	79
17 Resultado das análises de extrato seco e crioscopia	80

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. A distribuição do nitrogênio no leite.....	18
2. Submicela e micela de caseína segundo SCHMIDT (59)	24
3. Representação das interações entre soroproteína e caseínas no leite cru e aquecido. WOLFSCHOON-POMBO (74).....	37
4. Célula epitelial secretora (simplificada) de LARSON (32).....	40
5. Síntese da cadeia peptídica segundo Krüger. Em WOLFSCHOON-POMBO (66)	42
6. Localização dos grupos fosfato e sítio de fosforilação em potencial na sequência de aminoácidos das caseínas. MERCIER & GAYE (38)	45
7. Curva de calibração do fósforo	54

Figura	Página
8. Variação sazonal do conteúdo relativo de caseína (nº de caseína) e do fator de fósforo em amostras genuínas de leite em pó desnatado.....	68
9. Correlação entre o fósforo caseínico e conteúdo de caseína do leite cru	70
10. Correlação entre o número de caseína e a porcentagem de soro na mistura de leite pasteurizado e soro de queijo	75

1. INTRODUÇÃO

A qualidade do leite consumido no país sempre foi uma preocupação dos técnicos, nutricionistas, bioquímicos e demais profissionais, pesquisadores e autoridades ligadas à área de laticínios. No Brasil esta questão é ainda de maior relevância quando se depara com uma população na sua grande maioria subnutrida ou mal nutrida e ainda de baixo poder aquisitivo.

Por ser um produto nobre e complexo, o leite requer cuidados especiais na sua produção, transporte, beneficiamento, armazenamento e comercialização. Seus componentes refletem qualitativa e quantitativamente o efeito de qualquer tratamento e, principalmente quando é objeto de adulterações.

Já houve época em que a simples aguagem do leite fornecia ao produto, transportador ou industrial de laticínios lucros desonestos. Hoje, entretanto, com os recursos de que dispõem os laboratórios de análises, esta adulteração simples é facilmente detectável, estimulando a criatividade daqueles que procuram de maneira ilícita, obter lucro, fraudando o leite.

Eis que o soro proveniente da fabricação de queijos, que constitui um subproduto ainda não totalmente aproveitado, muitas vezes desprezado na indústria, tem sido usado com esta finalidade,

ou seja, fraudar o leite de consumo.

O soro de queijo tem sido pesquisado há vários anos e, seu aproveitamento racional é bastante interessante para a indústria por, entre outros aspectos, conter proteínas de alto valor (soroproteínas) além da quase totalidade dos sais minerais e lactose do leite que o originou, WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO (70). Assim, o soro de queijo encontra utilização, por exemplo, em sorvetes e sobremesas, farinhas lácteas e similares, iogurte, bebidas lácteas, etc; sendo então um componente ou complemento de vários alimentos (principalmente lácteos) a baixo custo, CAL-VIDAL (9), KOSIKOWSKI (31). Vê-se aí o enorme potencial do soro de queijo que, por ser de baixo custo, sua utilização é economicamente viável e de importância como alimento, existindo inclusive programas sociais de relevância fomentando sua utilização (sobretudo na forma de bebidas lácteas) para população de baixa renda, VIEIRA & NEVES (55).

Não se pode ignorar a importância do soro de queijo, também sob o ponto de vista econômico. No Brasil, segundo estatísticas da Secretaria de Inspeção de Produtos Animal do Ministério da Agricultura, o volume de leite destinado à fabricação de queijos foi, em 1985, de 1,3 bilhões de litros, originando perto de 135.000 toneladas de queijos de diferentes tipos e gerando em decorrência, ao redor de 1,2 bilhões de litros de soro.

No entanto, tal produto (soro de queijo), não pode ser usado indiscriminadamente "incorporado" ao leite de consumo como forma pura e simples de "aumentar a produção" de leite fluido e em pó, pois uma vez incorporado ao leite estará subtraindo do consumidor

elementos presentes no leite original, genuíno, que este está pagando para receber. Acredita-se, sinceramente, que o leite poderia ser comercializado com porcentagens de soro de queijo, desde que discriminadas no produto, ou seja, que haja regulamentação própria para que este novo produto seja então caracterizado e diferenciado do leite pasteurizado, tendo ainda obviamente, preço mais acessível.

De acordo com o artigo 543 da Legislação Brasileira de Laticínios, BRASIL (5), o leite pasteurizado não pode conter nenhuma substância estranha adicionada (por exemplo: água, preservativos) e, embora não seja mencionado textualmente, a adição de soro de queijo é também uma fraude.

O produto final desta mistura fraudulenta (leite mais soro de queijo) apesar de não apresentar todas as mesmas características do leite genuíno, não é detectado por técnicas de rotina do controle de qualidade do leite, motivo pelo qual algumas técnicas foram então desenvolvidas com a finalidade específica de detectar este tipo de adulteração. Estes métodos desenvolvidos baseiam-se principalmente na alteração da distribuição proteica original do leite provocada por adição de soro de queijo, examinando-se esta distribuição nos níveis de NITROGÊNIO, AMINOÁCIDOS e PROTEÍNAS propriamente.

Em muitos casos, a aplicação efetiva destes métodos no país é proibitiva, uma vez que o trabalho necessita ser executado com equipamentos e reagentes caros e por técnicos altamente especializados. Isto impossibilita sua ampla difusão e aplicação efetiva

em muitos países, ou condiciona seu emprego a alguns poucos órgãos governamentais de pesquisa (ou mesmo instituições privadas), centralizando as análises, o que, devido à nossa vasta extensão territorial, pode inviabilizar sua utilização. Da mesma forma existem algumas restrições quanto à origem do soro e as condições de armazenamento da amostra que dificultam sua detecção, tornando certos métodos pouco precisos, e, às vezes, inexatos.

O novo método consiste na determinação do fósforo caseínico e do nitrogênio proteico das amostras. Baseado em uma taxa de 0,85% (fósforo caseínico/100g de caseína) e um fator Kjeldahl de 6,34 KARMAN E VAN BOEKEL (28) o conteúdo relativo de caseína (porcentagem do nitrogênio caseínico no nitrogênio proteico ou simplesmente "número de caseína") pode ser calculado:

$$I - N_t - NPN = NP$$

$$II - P_t - P_{tca} = P_{cas}$$

$$III - (P_{cas} \div 0,85 \div 6,34) \times 100 = N_{cas}$$

$$IV - (N_{cas} \div N_p) \times 100 = \text{número de caseína}$$

onde: N_t = Nitrogênio total

NPN = Nitrogênio não proteico

N_p = Nitrogênio proteico

P_t = Fósforo total

P_{tca} = Fósforo solúvel em TCA

P_{cas} = Fósforo caseínico

N_{cas} = Nitrogênio caseínico

Sendo os valores de N_p e P_{cas} expressos em g%.

A adição de soro de queijo irá diminuir o número de caseí

na do leite e aumentar o teor de proteínas do soro.

Em vistas destas considerações, o presente trabalho teve como objetivos principais:

1. Estudo da distribuição do nitrogênio do leite, como forma de detecção da fraude por adição de soro de queijo;

2. Separação e quantificação do fósforo esterificado à caseína (fósforo caseínico) para determinação do valor exato da relação Nitrogênio caseínico/Nitrogênio proteico, como forma de identificar e quantificar fraude em leite pasteurizado, adicionado de soro de queijo;

3. Estabelecer correlação entre o número (teor) de caseína e a porcentagem de soro na mistura de leite pasteurizado e soro de queijo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Método para Detecção de Soro de Queijo Adicionado ao Leite.

Vários métodos são propostos para detectar a adição de soro de queijo ao leite. Estes métodos foram desenvolvidos para pesquisar principalmente fraude de soro em pó em leite em pó e não, no produto fluido. É fácil explicar tal preocupação uma vez que a maioria destes métodos foi desenvolvida em países da Europa onde durante os últimos anos tem aumentado enormemente a produção de leite e soro em pó, sendo o leite em pó produto de exportação. Na América Latina fatores como a baixa produtividade das vacas leiteiras, as variações sazonais (fatores climáticos), política governamental etc, contribuem para o aumento na comercialização do produto, principalmente sob a forma de leite reconstituído. Daí a preocupação específica com o leite em pó nestes países, interessados em garantir a qualidade do leite de consumo.

No Brasil, há de se atentar para, principalmente, o problema do leite fluido que é sem dúvida a forma como é comercializado em maior escala atingindo um número maior de consumidores.

Os métodos existentes têm sido objeto de estudos, e, via de

regra, aprimorados. Podem ser agrupados de acordo com seu princípio fundamental, não obstante, conforme já mencionado, preocupam-se particularmente com as alterações sofridas devido a adição de soro de queijo na distribuição das proteínas do leite. Concentram-se principalmente na pesquisa do nitrogênio, aminoácidos e proteínas propriamente do leite e soro, sua quantificação, alterações sofridas em suas estruturas, etc.

Outros métodos baseados em princípios diferentes são também relacionados.

2.1.1. Método baseado nos teores de cistina e cisteína

A técnica, inicialmente descrita por DE KONING & VAN ROOIJEN (17) e apurada, principalmente quanto ao seu tempo de execução, por MROWETZ & KLOSTERMEYER (41), baseia-se no fato de que as proteínas do soro e as caseínas contêm um teor característico e diferente dos aminoácidos sulfurados (Cistina e Cisteína). Como a relação entre caseína e soroproteína em leite autêntico é relativamente constante, conhecendo-se os limites de variação naturais destes elementos no leite em pó e, analisando-se uma amostra suspeita, pode-se comprovar que existe fraude se o teor de Cistina - Cisteína é superior àquele do leite em pó autêntico, genuíno.

Este método, na sua forma mais aprimorada em, LECHNER & KLOSTERMEYER (33) apresenta-se como dos mais confiáveis e seguros para a detecção deste tipo de fraude. Apesar de desenvolvido para análise de amostras pulverizadas, pode ser adaptado para leite fluido. No entanto, cabe lembrar que o método - que utiliza a

Polarografia (Voltametria) - torna-se proibitivo e restrito para utilização e difusão no país devido às exigências (equipamento altamente sofisticado e pessoal especializado). Recentemente, HILL et alii (24) publicaram um método baseado no mesmo princípio.

2.1.2. Método baseado em observação microscópica em luz Polarizada

O método, desenvolvido pelo holandês MOL, conforme LOKO (34) baseia-se na observação microscópica de uma suspensão de produto (leite em pó). Consiste no fato de que os sais coloidais de cálcio e fósforo, que ficam no soro após a sinérese da coagulada durante a fabricação do queijo, cristalizam no processo de concentração a que o soro é submetido posteriormente na sua secagem para fabricação do pó. Estes cristais de cálcio e fósforo presentes na amostra materializam-se quando em suspensão com lugol e dimetilsulfóxido (DMSO) adquirindo configurações diferentes: aculeiforme e roseta. Pode-se então concluir na observação microscópica em luz polarizada que, se estes cristais estiverem presentes em amostra de leite em pó, esta poderá estar fraudada com soro em pó.

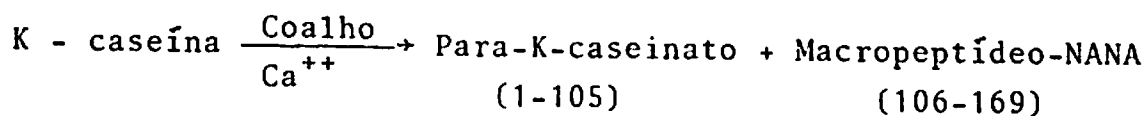
Apesar de serem observados em experimentos onde foram adicionados apenas 1% de soro em pó ao leite em pó, segundo LOKO (34), nos procedimentos de secagem da fabricação de leite em pó a estrutura das partículas pode variar muito, ocasionando um erro na avaliação microscópica. Por isso, segundo o mesmo autor, o método deve ser utilizado somente para realizar uma primeira seleção onde seria feita apenas uma classificação ou identificação rápida das amostras de leite em pó.

2.1.3. Métodos de dosagem do ácido siálico livre

A dosagem do ácido siálico, mais conhecido como NANA (ácido N-acetil neuramínico) é uma das técnicas mais difundidas na pesquisa da fraude do leite com soro de queijo.

O NANA é um componente natural do leite, encontrando-se ligado à sua proteína, na fração caseínica, formando parte da Kappa-caseína junto com outros carboidratos (N-acetil galactosamina e galactose), ALAIS (1).

Quando o coalho (enzima Quimosina - EC 3.4.23.4) atua sobre a caseína do leite, especificamente na ligação fenilalanina (105) - metionina (106) da sequência de aminoácidos da Kappa-caseína, um macropéptido hidrófilo correspondente à porção 106-169 desta caseína é removido e passa para o soro, enquanto a outra parte (1-105) da Kappa-caseína forma, junto com outras caseínas e sob a influência de íons cálcio, o gel denominado para-kappa-caseinato (a "coalhada" que irá dar origem ao queijo), ALAIS (1), WOLFSCHOON-POMBO (65).



O método de isolamento e dosagem do ácido siálico (NANA) foi inicialmente descrito por WARREN (61), onde após precipitação da amostra com ácido tricloroacético (TCA) 12%, da fração solúvel era então precipitado o glicomacropéptido (onde está presente o NANA) com adição de ácido fosfotúngstico 20%. Para isolamento do

NANA da fração macropeptídica, esta então sofre hidrólise com ácido sulfúrico 1N. Dentre os primeiros a utilizar a dosagem do NANA para detectar a adulteração do leite com soro cita-se DE KONING & VAN ROOIJEN (17).

O emprego crescente da dosagem do ácido siálico livre com fins de detecção da fraude do leite com soro de queijo foi incrementado a partir de sua normatização em 1981 após a publicação no Jornal Oficial das Comunidades Européias (ECC L 213/1 - 3) segundo descrito por LOKO (34), onde, determinado por espectrofotometria (580 nm) após complexação com resorcionol, a porcentagem de soro em pó adicionado ao leite em pó é calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ soro em pó} = \frac{(Z - Y) \times 100}{W}$$

onde: "Z" refere-se ao valor de ácido siálico (NANA) em $\mu\text{g/g}$ determinado na amostra;

"Y" representa o valor médio de NANA no leite em pó e

"W" representa o valor médio de NANA no soro em pó.

É fácil perceber que a utilização deste método no Brasil exige primeiramente um conhecimento prévio do teor de ácido siálico livre do leite, leite em pó e soro da produção nacional, seus valores médios e variações. É preciso conhecer também os parâmetros de tecnologia (como o efeito dos diversos tipos de tratamento térmico a que o leite está sujeito até virar pó) que podem influir na dosagem do NANA. Os valores descritos por LOKO (34), em que leite desnatado em pó apresenta em torno de 40-50 μg de NANA/g e soro em pó aproximadamente 10 a 20 vezes mais não devem ser utilizados. Assim,

para que o método se torne confiável e aplicável um grande número de amostras de leite em pó e soro em pó teriam que ser examinadas para que sejam estabelecidos valores médios para "Y" e "W" e suas variações, adequando-se às condições brasileiras a fórmula apresentada.

Acrescenta-se o fato de que investigações recentes feitas por POTGIETER (47) demonstraram que o método de dosagem do ácido siálico livre é influenciado por quantidades residuais de lactose, (que não é eliminada completamente na preparação da amostra) onde uma adição de 50-100 µg/ml no sobrenadante (livre de lactose) resultou em um aumento de 2,7-16% no conteúdo de ácido siálico determinado.

Este método foi então aprimorado e adaptado como método qualitativo para detecção também desta fraude em leite pasteurizado por WOLFSCHOON-POMBO & PINTO (73). Nesta forma modificada determina-se o ácido siálico livre por estectrofetometria empregando como complexante o reativo de Erlich (à base de p-dimetilaminobenzaldeído) em lugar do resorcional proposto no método original. Assim modificado, o método permite a detecção de soro adicionado sobre um limite de 2%. O método no entanto não se torna confiável para amostras de leite refrigerado por um período superior a 48 horas, onde a proteólise desencadeada por bactérias psicrófilas pode, eventualmente, liberar da fração proteica o NANA, induzindo um resultado "falso positivo".

RAMPILLI et alii (48) sugerem determinar a relação NANA/nitrogênio precipitado com TCA e ácido fosfotúngstico como forma de melhorar a eficácia do método.

A detecção de soro pelo método do ácido siálico apresenta também (como a quase totalidade dos métodos) a desvantagem de não detectar fraude quando se adiciona soro obtido da coagulação não enzimática ("soro ácido"). Isto porque, e conforme descrito em esquema anterior, a liberação do macropeptídeo (onde o NANA está ligado) da fração kappa-caseína se dá somente quando da coagulação enzimática (utilização do coalho) e não quando esta é realizada apenas com a adição de ácido, ALAIS (1).

2.1.4. Métodos baseados na determinação do glicomacropéptídeo

O glicomacropéptídeo corresponde à sequência de aminoácidos (fração 106-169) da kappa-caseína liberado quando da adição do coalho (quimosina), sendo solúvel no soro, ALAIS (1).

DE KONING et alii (19) propuseram um método de determinação do conteúdo de glicomacropéptídeo com a finalidade de detectar sólidos de soro adicionados ao leite em pó, baseado na determinação desse glicomacropéptídeo precipitado, por pesagem direta, após lavagem com etanol e desidratação. O glicomacropéptídeo se obtém após precipitação e separação das proteínas com ácido tricloroacético 12% e, à fração solúvel em TCA 12% adiciona-se ácido fosfotúngstico 20%. Assim, o peso da matéria seca representa uma estimativa do conteúdo do glicomacropéptídeo, indicativo da presença de soro na mistura.

Outro método, descrito por VAN HOOYDONK & OLIEMAN (54) para acompanhar a ação proteolítica do

coalho sobre a kappa-caseína foi empregado por OLIEMAN & VAN DEN BEM (44) para quantificação do glicomacropéptido correlacionando-o à adição de soro ao leite. Neste método, que utiliza a cromatografia de alta pressão (HPLC), o leite em pó é reconstituído, adicionado de coalho (quimosina) e, após um período determinado onde as proteínas são removidas por adição de ácido tricloroacético, 15 µl do filtrado são injetados automaticamente no aparelho onde após 40 minutos obtém-se o cromatograma completo.

O método apresenta excelentes resultados, detectando até 0,8% de sólidos totais de soro adicionados ao leite desnatado. Cabe lembrar, entretanto, que a utilização desta técnica exige um estudo criterioso dos teores de glicomacropéptido no leite e soro (líquido e pó) para sua aplicação efetiva no Brasil. Também a especificidade do método não permite detectar, como no método anterior (determinação do ácido siálico livre), soro de queijo proveniente de coagulação não enzimática.

Descrito por VILELA (56) em trabalho recente, um novo método é sugerido para a detecção de soro de queijo adicionado ao leite em pó e pasteurizado. A determinação do glicomacropéptido desta vez é feita utilizando técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, após sua extração e obtenção no filtrado da amostra com procedimentos semelhantes aos descritos na técnica anterior. O método permite detectar níveis de adulteração de pelo menos 0,5% de soro, em sua forma líquida ou pó, adicionado ao leite pasteurizado ou leite em pó. Não deve ser usado como método quantitativo e sim qualitativo com excelente desempenho. Apresenta-se, co-

mo todo método baseado na determinação do glicomacropéptido, incapaz de detectar soro de queijo quando este provém da coagulação não enzimática do leite. Também o tempo total necessário para a execução de um gel de eletroforese e sua posterior análise pode ser considerado excessivo se comparado, por exemplo, com uma análise semelhante utilizando HPLC (não obstante a técnica eletroforética ser capaz de analisar um número maior de amostras simultaneamente).

2.1.5. Método crioscópico

O método desenvolvido por CASTAÑEDA et alii (13), baseia-se no fato de que o soro em pó possui mais moléculas solúveis em água (por unidade de massa) que o leite em pó, apresentando assim uma maior "depressão" do seu ponto de congelamento. Estima, segundo uma equação, a porcentagem de soro em pó adicionado ao leite em pó com um limite de detecção de 2,5%, não apresentando valores efetivos quando a amostra de leite em pó sofreu neutralização ou delactosagem.

O método foi desenvolvido para amostras em pó, não tendo sido testado em amostras fluidas de soro de queijo ou leite. Acrescenta-se o fato de que a crioscopia é influenciada por qualquer substância adicionada ao leite (solúvel em água), além do que a simples fraude por aguagem, realizada criteriosamente, poderia "mascarar" a fraude do soro, diminuindo a depressão do ponto de congelamento da amostra.

2.1.6. Métodos baseados na determinação de aminoácidos

Em 1986, GRENBORG & DOWER (22) publicaram um método analítico para a detecção de concentrado de soroproteína adicionado no leite em pó desnatado, baseado na determinação de aminoácidos alanina (ala), ácido aspártico (asp) e prolina (pro). O método é eficaz para adições de no mínimo 10%, indistintamente se o soro é "ácido" ou "doce" (proveniente da coagulação ácida ou enzimática, respectivamente). O método analítico tem a desvantagem de ser oneroso e o tempo de determinação extremamente longo.

2.2. A Importância da Fração Nitrogenada no Reconhecimento da Fraude.

Quando da fraude do leite por soro de queijo, o produto final (leite fraudado) não é identificado nos métodos habituais de controle de qualidade conforme já observado. Isto deve-se ao fato, principalmente, de que o soro proveniente de fabricação de queijos apresenta, em muitos aspectos, semelhanças com o leite; WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO (70). As pequenas modificações que ocorrem, por exemplo, na concentração das substâncias que nele se encontram em solução (sais minerais e lactose) não são, por si, fontes de pesquisa segura para quantificar a fraude. Da mesma forma, a diminuição de teor relativo de sólidos não pode ser usado como indicativo

seguro desta fraude, pois, a simples aguagem do leite causaria tam
bém efeito semelhante.

Assim, estudando a fundo a composição do soro de queijo e leite, os pesquisadores optaram por desenvolver métodos que, de alguma forma, identificam através das alterações na fração nitroge
nada a fraude por adição de soro, seja investigando as mudanças ao nível dos aminoácidos, polipeptídeos ou proteínas, conforme já ex
posto no capítulo anterior.

Os métodos propostos levam em consideração a principal modificação que o leite sofre ao "transformar-se" em queijo, que é o fenômeno de sua coagulação. Durante esta, na qual as proteínas do leite estão intimamente relacionadas, ocorre a separação das ca
seínas e soroproteínas originando, respectivamente, um gel que irá dar origem ao queijo e uma fase solúvel, convencionalmente chamada de soro. E é justamente por este soro não conter a fração proteica caseínica (salvo alguns traços) e somente as soroproteínas, que estabeleceu-se o principal caminho para detecção deste tipo de fraude. Um leite autêntico, genuíno, possui suas proteínas assim divididas: caseína e soroproteínas na forma integral, em uma pro
porção de composição relativamente estável (80:20); segundo WALSTRA & JENNESS (59), ao passo que um leite fraudado com soro de queijo terá um teor relativo de caseínas e soroproteínas diferentes daquela relação original.

É de se esperar, portanto, que o leite fraudado com soro de queijo apresente um teor maior de soroproteínas em relação às caseínas diferentes do leite genuíno, o que também implica algumas outras mudanças na distribuição do nitrogênio proteico, inspirando assim a elaboração dos diversos métodos analíticos.

O método polarográfico descrito por LECHNER & KLOSTERMEYER (33) e outros já relacionados fundamenta-se numa destas mudanças. Como as caseínas e soroproteínas possuem teores distintos de aminoácidos sulfurados (cistina e cisteína), sendo estes encontrados em maior número entre as soroproteínas, um leite fraudado com soro de queijo terá um teor diferente (maior) destes aminoácidos se comparado ao leite autêntico.

Da mesma forma, os métodos baseados na determinação do glicomacropéptido (GMP), conforme OLIEMAN & VAN DEN BEDEM (44); VILELA (56) e outros também de dosagem do ácido siálico livre (NANA), conforme LOKO (34), WOLFSCHOON-POMBO & PINTO (73) e outros apoiam-se inteiramente no fenômeno de coagulação enzimática do leite para sua fundamentação. Isto, conforme citado, deve-se ao fato de que durante a coagulação do leite em sua fase primária, segundo ALAIS (1), a ação do coalho (quimosina) permite a liberação para a fase solúvel (soro) do glicomacropéptido (parte integrante da porção hidrofílica da kappa-caseína). Este péptido (GMP), tem por sua vez como integrante da sua estrutura o ácido siálico (NANA), WOLFSCHOON-POMBO (65), ALAIS (1). A presença então no soro de

queijo, destas estruturas (GMP e NANA), inspirou diversos autores no desenvolvimento de métodos para detecção desta fraude.

2.3. O Nitrogênio e as Proteínas do Leite

O leite bovino contém cerca de 5,3 g de nitrogênio por quilograma. Deste, aproximadamente, 95% está na forma de proteínas (NP) e 5% como nitrogênio não proteico (NPN). No leite exposto ao ar, ainda encontra-se cerca de 15 mg por quilograma de nitrogênio gasoso.

Em torno de 80% do nitrogênio (NP) de leite consiste de nitrogênio caseínico (NC) e 20% de nitrogênio não caseínico, ou nitrogênio das proteínas do soro (NPS) (Ver Figura 1). As caseínas são um grupo de fosfoproteínas específicas do leite as quais se precipitam com acidificação a pH 4,6, presente na forma de micelas WALSTRA & JENNESS (59). Nesta categoria são incluídas quatro tipos de cadeias polipeptídicas designadas α_{S_1} , α_{S_2} , β e κ -caseínas, junto com alguns derivados formados por proteólise destas. As proteínas do soro consistem em um grupo bastante diversificado de proteínas, as quais se mantêm em solução a pH 4,6, como a α -lactalbumina, β -lactoglobulina, albumina de soro bovino (BSA), imunoglobulinas e péptides de baixo peso molecular proveniente de hidrólise das caseínas. (Ver Tabelas 1 e 2).

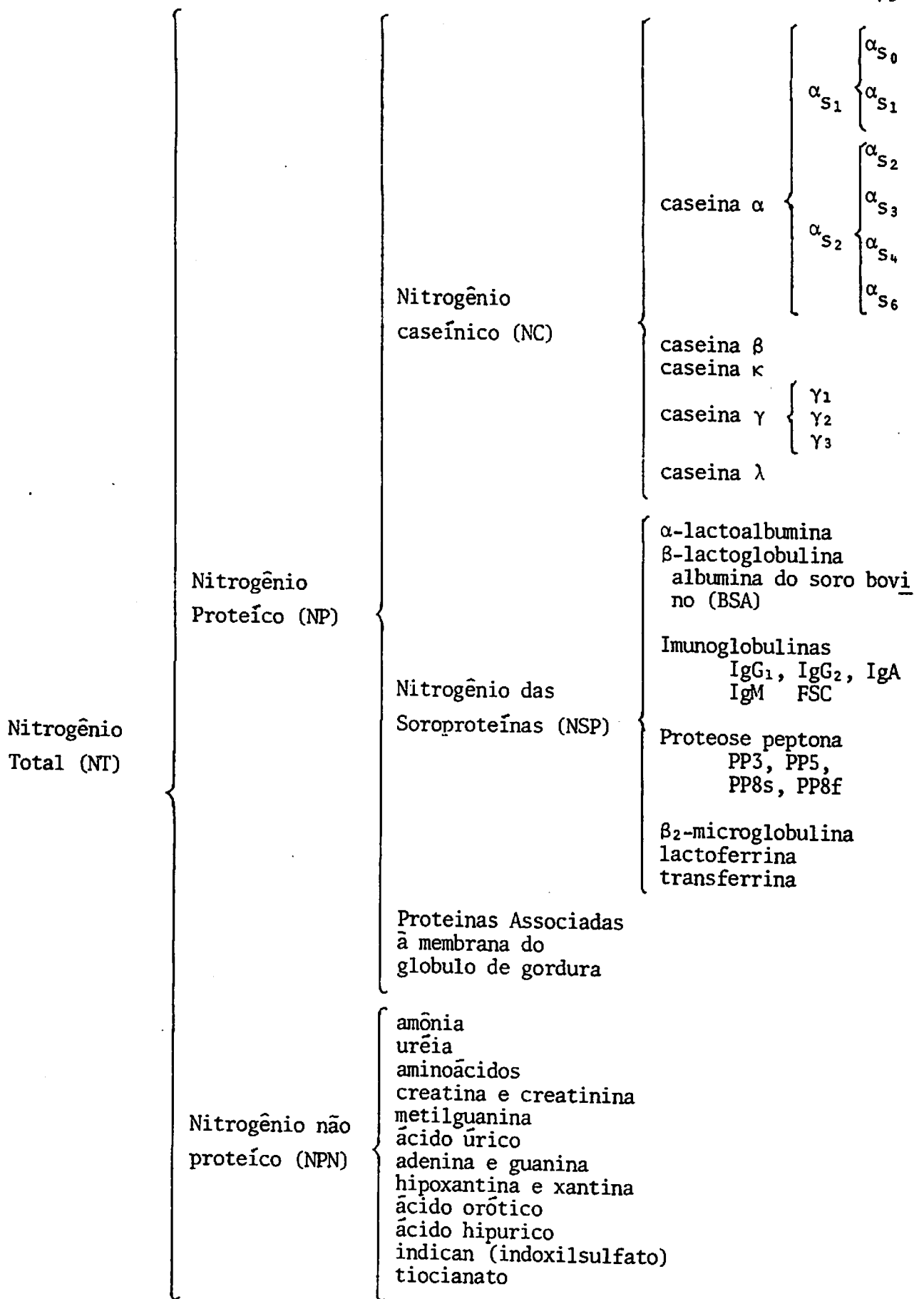


FIGURA 1 -- A distribuição do nitrogênio no leite.

TABELA 1 - Concentração das proteínas no leite. (Adaptada)

Constituintes	Concentração no leite g/kg	Porcentagem (% P/P) de Nitrogênio Proteico
. Proteína Total (NP)	33,0	100
. Caseína Total (NC)	26,0	79,5
. Soroproteínas (NSP)	6,3	19,3
. Prot. associadas à membrana do glóbulo de gordura	0,4	1,2
α_{S_1} -caseína	10,0	30,6
α_{S_2} -caseína	2,6	8,0
β -caseína	9,3	28,4
γ -caseína	0,8	2,4
κ -caseína	3,3	10,1
α -lactoalbumina	1,2	3,7
β -lactoglobulina	3,2	9,8
Albumina do soro bovino (BSA)	0,4	1,2
Imunoglobulinas	0,7	2,1
Outras (incluindo proteose-peptona)	0,8	2,4

WALSTRA & JENNESS (59).

TABELA 2 - Propriedades de algumas proteínas do leite. (Adaptada)

Propriedades	Caseínas				Soroproteínas		
	α_{s_1} - <u>B</u>	α_{s_2} - <u>A</u>	β - <u>A</u> ²	κ - <u>B</u>	α -La- <u>B</u>	β -Lg- <u>B</u>	BSA
Peso molecular	26614	25230	23983	19023 ^a	14176 ^a	18363	66267
Resíduo de amino- ácidos/moléculas	199	207	209	169	123	162	582
Fósforo	8	11	5	1	0	0	0
Carbohidrato	0	0	0	+	b	c	0

a = exclusivo de resíduos de carboidratos

b = uma pequena fração das moléculas

c = 0, exceto uma variante rara (Dr).

A, A² e B representam variantes genéticas

WALSTRA & JENNESS (59).

O nitrogênio não proteico corresponde a substâncias que contêm nitrogênio na sua molécula mas que não são proteínas nem vitaminas WOLFSCHOON-POMBO (66). Compõe-se de produtos resultantes do metabolismo do animal e que, partindo do sangue e/ou da própria célula secretora, chegam até o leite. (Ver Tabela 3).

2.3.1. As caseínas

As caseínas se apresentam no leite sob a forma de micelas com 20 a 300 nm de diâmetro. Tais micelas contêm matéria inorgânica, como fosfato de cálcio (8g/100g de caseína) e enzimas como lipase e plasmina. O complexo caseínico é composto por pequenos agregados chamados submicelas com 10-20 nm de diâmetro, contendo diferentes moléculas de caseínas mantidas unidas por interações hidrofóbicas e, principalmente por fosfato de cálcio coloidal WALSTRA & VAN VLIET (60). (Ver Figura 2).

A κ -caseína possui regiões de grande hidrofilia em sua molécula, se orientando para o lado de fora da micela, enquanto que as demais se orientam para o interior. Isto ocasiona um impedimento estérico e eletrostático a uma maior aglomeração da micela. WALSTRA & VAN VLIET (60).

TABELA 3 - Componentes da fração NPN do leite

Componentes	mg/100g de leite
NPN (Total)	29,64
Úreia-N	14,21
Amino-N	4,43
Peptídeo-N	3,20
Creatina-N	2,55
Ácido Orótico-N	1,46
Creatina-N	1,21
Amoníaco-N	0,88
Ácido Úrico-N	0,78
Ácido Hipurico-N	0,44

WOLFSCHOON-POMBO (66)

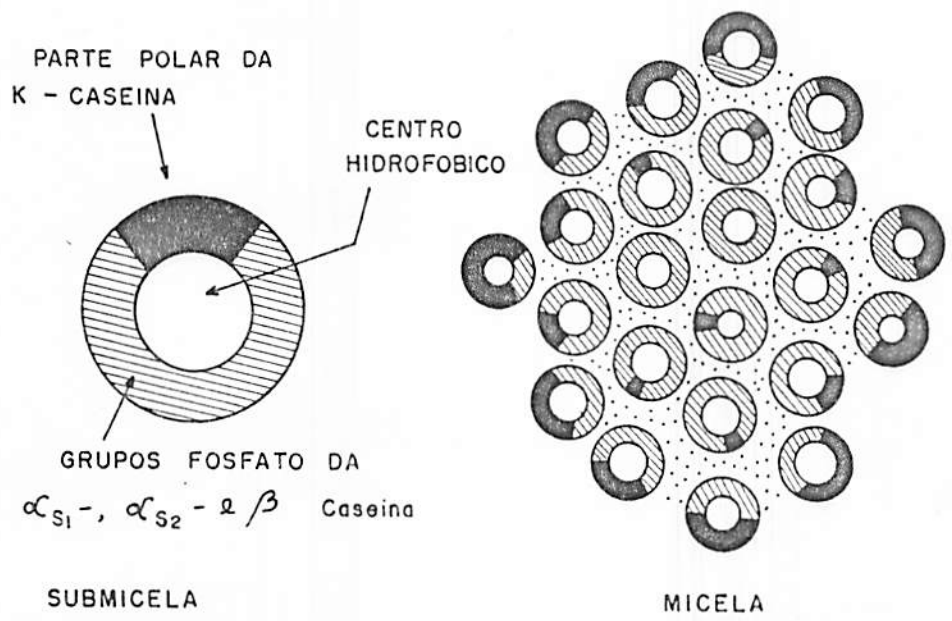


FIGURA 2 - Submicela e micela de caseína segundo SCHMIDT (50).

Alguns fatores são importantes e influenciam na estabilidade da micela, tais como: sais, pH, temperatura, enzimas, agentes desidratantes, oxidantes e redutores; indutores de pontes de hidrogênio, detergentes, fenol, etc.

A cadeia polipeptídica da α_{S_1} -caseína consiste de duas regiões predominantemente hidrofóbicas (resíduos 1-44 e 99-199) e uma zona altamente carregada (45-89), a qual contém todos os seus grupos fosfato. WALSTRA & JENNESS (59). Apresenta quatro variantes genéticas: A, B, C e D segundo MERCIER & GAYE (38). Precipita a baixas concentrações de Ca^{++} (7 mM Ca^{++} ; 28mMNaCl). É a proteína mais abundante no leite sendo uma mistura de duas proteínas α_{S_0} e α_{S_1} as quais tem uma cadeia polipeptídica comum.

Apresentando uma estrutura dipolar, com concentração de cargas negativas próximas ao N-terminal e positivas próxima do C-terminal, a α_{S_2} -caseína é ainda mais sensível ao cálcio do que a α_{S_1} -caseínas. Sob esta designação (α_{S_2} -caseína) se agrupa uma série de caseínas menores (α_{S_2} , α_{S_3} , α_{S_4} e α_{S_6}) cada cadeia polipeptídicas idênticas, diferindo nos grupos fosfato (13, 12, 11 e 10 mols p/mol proteína, respectivamente). Originalmente, designou-se uma fração α_{S_5} , mas hoje sabe-se que ela consiste de uma molécula de α_{S_2} e outra de α_{S_4} unidas por ligação dissulfeto.

A β -caseína consiste em um polipeptídeo com 209 resíduos de aminoácidos, apresentando uma estrutura primária rica em prolina. É sensível ao cálcio a 20°C, mas a baixas temperaturas (-10°C) permanece solúvel em sua presença, a 4°C se encontra sob a forma de monômero, mas à temperatura ambiente ocorrem polímeros

de 20-24 unidades, WALSTRA & JENNESS (59).

Por ser solúvel na presença de uma ampla faixa de concentração de cálcio e gradiente de temperatura, a κ -caseína ocupa uma posição excepcional dentro das caseínas, atuando com agente estabilizador da micela. É glicosilada, contendo, aproximadamente, 1,3% de galactose, 2% de ácido-N-acetilneuramínico e 1,4% N-acetil-galactosamina. É rapidamente hidrolisada na ligação Fenilalanina (105) - Metionina (106) pela enzima quimosina (EC.3.423.4), fornecendo um fragmento N-terminal chamado para- κ -caseína e um segmento C-terminal chamado caseinomacropeptídeo, o qual contém todos os seus grupos glicídicos e fosfatos, e que é perdido no soro quando da fabricação de queijos WALSTRA & JENNESS (59).

Um grupo de caseínas designado como γ -caseína corresponde a porções C-terminais da cadeia de β -caseína. Estas são formadas por hidrolise endógena da β -caseína nas posições 28-29, 105-106 e 107-108 pela enzima plasmina. Os fragmentos menores ocorrem no soro quando a caseína é precipitada por ácido, indo constituir a fração das proteínas do soro chamada proteose-peptona. (Ver Tabela 4).

Já a chamada λ -caseína corresponde a uma pequena quantidade de péptides presentes no leite, originados da proteólise da α_{s1} -caseína pela enzima plasmina.

2.3.2. As soroproteínas

Quando o leite é acidificado a pH 4,6, as caseínas

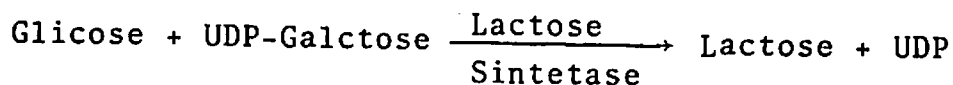
TABELA 4 - Nomenclatura dos fragmentos provenientes da β -caseína
(Adaptada)

Fragmento	Nome
29-209	γ_1 -caseína
106-209	γ_2 -caseína
108-209	γ_3 -caseína
1-105	componente 5 (PP5)
1-107	
29-103	componente 8 "slow" (PP8s)
29-107	
1-28	componente 8 "fast" (PP8f)

WALSTRA & JENNESS (59).

precipitam-se. O soro sobrenadante contém várias proteínas que, coletivamente, são chamadas de soroproteínas. A maioria é composta de proteínas globulares, com uma compacta estrutura tridimensional, sendo susceptíveis à desnaturação por calor. Se inclui também nesta categoria frações resultantes da proteólise da caseína (proteose-peptona). Um elemento resultante da quebra da caseína pela quimosina, o caseinomacropeptídeo, ocorre no soro proveniente de coagulação enzimática do leite.

Dentre as proteínas do soro, a α -lactoalbumina tem um papel fundamental na biossíntese da lactose na célula secretora do leite, interagindo com a enzima galactosiltransferase formando a enzima lactose sintetase, a qual catalisa a reação:



Possui ainda o maior teor em triptofano entre todas as proteínas naturais conhecidas.

Representando cerca de 50% do total entre as proteínas do soro, a β -lactoglobulina é sua principal proteína. No leite, à temperatura ambiente, encontra-se na forma de um dímero (Peso molecular = 37.000), que dissocia a valores de pH inferiores a 3,4 WALSTRA & JENNESS (59). Ainda não se estabeleceu sua função biológica, porém ela pode estar envolvida no metabolismo do fósforo segundo MERCIER & GAYE (38).

Maior componente do soro sanguíneo, a albumina do soro bovino (BSA) é sintetizada no fígado e ocorre no leite

através das células secretoras, correspondendo a cerca de 1,2% do nitrogênio proteico (NP), mas no início da lactação ou em um quadro de infecção mamária, este teor pode aparecer aumentado, sugerindo uma indicação de permeabilidade do epitélio mamário. Pouco se conhece a respeito do seu comportamento no leite e produtos lácteos e de sua possível influência nas propriedades desses.

As imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas que atuam como anticorpos durante a resposta imunológica do organismo frente a um antígeno. No leite se apresentam sob a forma de dois tipos de cadeias polipeptídicas unidas a uma unidade básica. Podem exercer ação antimicrobiana, particularmente a IgM, a qual tem ação, por exemplo, contra estreptococos, WALSTRA & JENNESS (59). As imunoglobulinas estão entre as soroproteínas mais sensíveis ao calor. Sua concentração no soro sanguíneo bovino, colostro e leite é apresentada na Tabela 5.

Consistindo de uma cadeia polipeptídica simples a β_2 -microglobulina apresenta-se com cerca de 100 aminoácidos, e um peso molecular de 11.800. Está presente em vários fluidos biológicos e em membranas celulares. A proteína cristalizada do leite bovino e designada anteriormente como lactolina foi mostrada em 1977, como sendo a β_2 -microglobulina. Análises diretas da concentração desta proteína no leite bovino não tem sido feitas; as quantidades isoladas do colostro e leite estão entre 6 e 2 mg/l, respectivamente.

Duas glicoproteínas capazes de se ligar e transportar o ferro são encontradas no leite: a transferrina, que é

TABELA 5 - Concentrações de imunoglobulinas no soro sanguíneo bovino, colostro e leite

Imunoglobulinas	g/kg			Porcentagem do total de Ig		
	Soro	Colostro	Leite	Soro	Colostro	Leite
Ig G ₁	11,0	47,6	0,6	50,0	81,0	73,0
Ig G ₂	7,9	2,9	0,02 ^a	36,0	5,0	2,5
Ig A	0,5	3,9	0,14	2,0	7,0	18,0
Ig M	2,6	4,2	0,05	12,0	7,0	6,5
FSC	-	0,2	0,05	-	-	-

a = Vários autores descrevem o conteúdo de Ig G₂ até 10 vezes este valor.

WALSTRA & JENNES (59).

uma proteína típica do plasma sanguíneo, e a lactoferrina, que é secretada por várias glândulas (mamária, lacrimal, salivar), pela mucosa endometrial e pelos rins. Apresentam-se como longas cadeias polipeptídicas simples com 600-700 resíduos, diferindo-se na composição entre aminoácidos e na mobilidade eletroforética. As concentrações destas proteínas variam bastante entre espécies e durante a lactação. Apresentam atividade bacteriostática por se ligarem ao ferro e reduzirem a quantidade deste metal disponível e essencial ao crescimento microbiano, porém, tal ação no leite não é significativa.

A fração proteose-peptona das soroproteínas compreende quatro componentes principais: 3, 5, 8 "slow", 8 "fast". O componente 3 possui um alto teor de carboidrato e é, provavelmente, derivado de um constituinte da membrana do glóbulo de gordura. Os demais componentes são oriundos da hidrólise da β -caseína. (Ver Tabela 4).

Outras proteínas que ocorrem no leite em pequena quantidade, tais como glicoproteínas ácidas, galactotermína e ceruloplasmina também são classificadas em soroproteínas.

2.3.3. Proteínas associadas à membrana do glóbulo de gordura.

A membrana do glóbulo de gordura contém cerca de 50% de proteínas, que correspondem, aproximadamente, 1% das proteínas totais do leite. Alguns destes componentes proteicos são enzi-

mas e outros são componentes não enzimáticos como a fração 3 da proteose-peptona. Tais proteínas são de difícil estudo pois apresentam uma forte interação entre si e com os lípidos, além de muitas serem insolúveis.

2.4. Fatores que Afetam o Teor de Proteínas do Leite

A Tabela 1 mostra valores médios para o teor das frações que compõem o NP do leite, porém tal teor varia em função de fatores como espécie, raça, estágio de lactação, dieta e infecções mamárias. O teor de caseína, por exemplo, é baixo no leite humano e alto no leite de coelha; no leite bovino as caseínas correspondem a mais de 75% das proteínas totais, enquanto que nos leites humano e equino as caseínas e soroproteínas estão presentes em proporções quase iguais. MERCIER & GAYE (38).

O estágio de lactação tem uma considerável influência nas proteínas do leite, particularmente no início e próximo ao final da lactação. O colostro é bastante rico em proteínas, contendo uma grande quantidade de imunoglobulina, caseína, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina em concentração duas vezes maior que aquela encontrada no meio da lactação. Durante a transição do colostro para o leite, a quantidade de proteína total cai rapidamente no início e depois mais devagar até que um mínimo é alcançado em 5-10 semanas após o parto. Após isto a quantidade tende a crescer vagarosamente até próximo do fim da lactação, quando um aumento intenso ocorre,

o qual parece ser dependente do fato do animal entrar em gestação.

Todas as principais proteínas do leite apresentam polimorfismo genético, que é normalmente devido à substituição de um ou mais aminoácidos na estrutura primária, ou também devido à falta de até nove aminoácidos da mesma. São conhecidas quatro variantes genéticas da α_{s_1} e α_{s_2} -caseínas (A, B, C e D); oito variantes da β -caseína (A^1 , A^2 , A^3 , B, Bzm, C, D e E); três da κ -caseína (A, B e C); seis da β -lactoglobulina (A, B, C, D, Dr, e W) e duas da α -lactoalbumina (A e B). WOLFSCHOON-POMBO (66).

A variação genética, representada pelas diferenças entre as raças bovinas utilizadas para a produção de leite, pode ter exemplificada sua influência nas proteínas do leite pelo fato de que os valores médios para caseína e soroproteínas serem maiores em leite de gado Jersey e Guernsey que no leite de gado Holstein e Ayrshire. A caseína do leite Holstein é mais rica em γ -caseína, pobre em β -caseína enquanto que suas soroproteínas contêm menos β -lactoalbumina. Diferenças existem também entre raças na distribuição das diferentes variantes genéticas de uma mesma proteína, onde segundo MERCIER & GAYE (38) as variantes A e B da κ -caseína ocorrem na razão de 0,8 a 0,2 respectivamente nas raças Ayrshire e de 0,1 e 0,9 na raça Jersey. Trabalho realizado por KARMAN & VAN BOEKEL (28) investigou a frequência das principais variantes genéticas das frações proteicas do leite, conforme Tabela 6.

De um modo geral, uma subalimentação ou uma alimentação com baixo teor energético, resulta em menores valores para proteínas no leite do que aqueles obtidos com uma alimentação adequada

TABELA 6 - Frequências das variantes genéticas de proteínas presentes no leite de diferentes raças

Proteína	Variante genética	Raças		
		Holstein-Friesian	Jersey	Guernsey
α_{S_1} -caseína	A	0,01	0	0
	B	0,93	0,70	0,75
	C	0,06	0,30	0,25
α_{S_2} -caseína	A	1,00	1,00	1,00
β -caseína	A	0,55	0,10	0,03
	A ¹	0,42	0,55	0,96
	A ²	0	0	0
	B ³	0,03	0,35	0,01
κ -caseína	A	0,74	0,20	0,65
	B	0,26	0,80	0,35
β -lactoglobulina	A	0,40	0,35	0,35
	B	0,60	0,65	0,65
α -lactoalbumina	A	0	0	0
	B	1,00	1,00	1,00

Adaptada de KARMAN E VAN BOEKEL (28).

enquanto que uma alimentação com alto teor energético leva a valores mais altos para as proteínas. A quantidade de proteína contida na dieta tem um pequeno efeito na concentração de proteínas no leite, a não ser quando este nível na dieta é muito baixo. Isto ocorre porque microrganismos do rumen podem sintetizar proteínas a partir de fontes de nitrogênio não proteico, como uréia e sais de amônio.

A influência de fenômenos de natureza meteorológica e climática na composição do leite durante o ano (variação sazonal) também é bastante conhecida, apesar de não ser totalmente esclarecida, conforme SANTOS et alii (49).

2.5. Efeitos da Pasteurização sobre as Proteínas do Leite

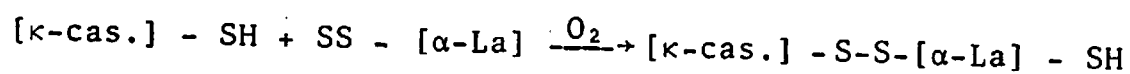
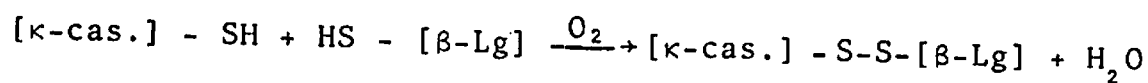
A pasteurização do leite, é atribuída ao alemão SOHXLET, que a introduziu em 1886. No Brasil, o sistema de pasteurização do leite de consumo é aquele conhecido como "HTST" (high temperature short time) também chamado de "pasteurização rápida" onde o leite é aquecido a aproximadamente 72-74°C por 15 a 20 segundos. WOLFS-CHOON-POMBO et alii (75). Esta temperatura e tempo de exposição a que o leite é submetido conduz a mudanças físico-químicas nas diferentes frações proteicas e, portanto, na distribuição do nitrogênio do leite. Segundo CARVALHO (11) e outros, entre as proteínas do leite, as soroproteínas são as mais sensíveis ao calor.

Dentre as alterações causadas pelo aquecimento (pasteuriza

ção) às proteínas do leite destaca-se a formação de associações e agregados entre as soroaproteínas (α -lactoalbumina e β -lactoglobulina) ocorrendo também complexos de soroaproteínas e caseínas, especialmente com a κ -caseína, (Ver Figura 3). Este fenômeno de associação ocorre devido à desnaturação das soroaproteínas pelo calor (principalmente a β -lactoglobulina), pois, ao contrário das caseínas, as proteínas do soro não formam micelas, encontrando-se molecularmente dissolvidas e susceptíveis à desnaturação térmica.

A desnaturação deve ser considerada como um desdobramento da estrutura compacta da molécula de proteína para uma forma menos organizada. Nesse sentido ocorrem mudanças nas estruturas quaternária, terciária e secundária da proteína, resultando na exposição de grupos funcionais internos.

A ativação de grupos sulfidrilas é uma das mudanças químicas que acompanham a desnaturação mais facilmente detectáveis, sendo observado particularmente na β -lactoglobulina, por ser a proteína do soro mais rica em grupamentos sulfidrilas CARVALHO (11). Esta ativação de grupamentos SH muito implica na formação dos complexos entre as proteínas do soro e a caseína (especialmente a κ -caseína) que reage com estes grupos SH das proteínas do soro desnaturadas, segundo KLOSTERMEYER, citado por WOLFSCHOON-POMBO et alii (74) que sugere o seguinte esquema:



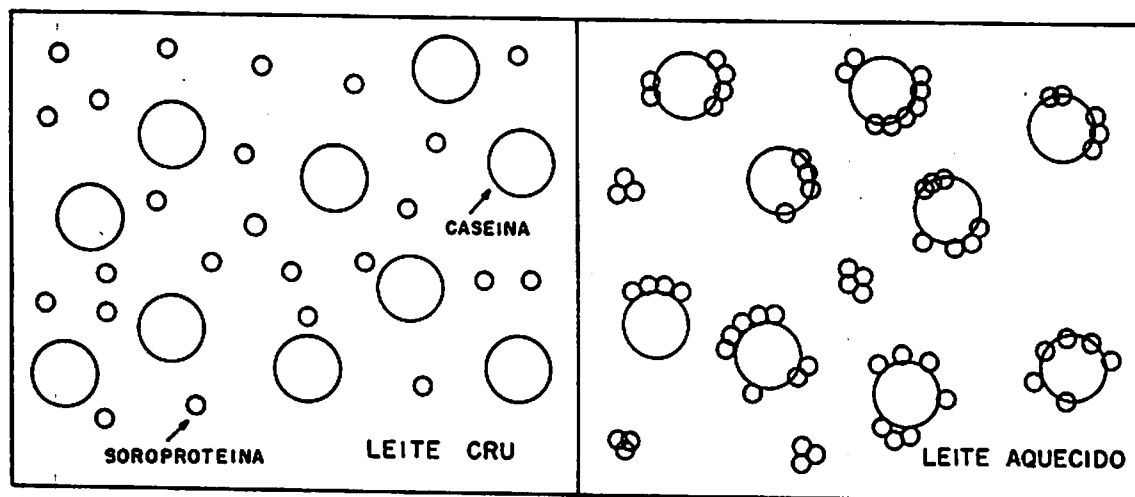


FIGURA 3 - Representação das interações entre soroproteínas e caseínas no leite cru e aquecido. BUCHHEIM & REIMERDES em: WOLFSCHOON-POMBO (67).

Este fenômeno explica o aumento aparente do nitrogênio caseínico em leites aquecidos pois estes complexos são co-precipitados junto com a caseína (quando da determinação do nitrogênio pelo método de Kjeldahl), resultando neste "aumento" demonstrado na Tabela 7).

Da mesma forma que houve um "aumento" do nitrogênio caseínico, também ocorreu uma "diminuição" do nitrogênio não caseínico (NCN) representado principalmente pelo nitrogênio das soroproteínas (em especial da β -lactoglobulina), proporcionais ao aumento de temperatura (tratamento térmico) aplicado ao leite.

2.6. Biossíntese e Secreção das Proteínas do Leite.

As proteínas do leite são sintetizadas na espécie bovina à semelhança de outras espécies. Nesta síntese, a sequência de aminoácidos da cadeia polipeptídica das proteínas também é determinada pelo material genético do DNA, composto por dois nucleotídeos (bases) púricos (adenina e guanina), dois pirimídios (citosina e timina) unidos a uma desoxiribose e fosfato. Em um processo de duplicação, conhecido como transcrição, o DNA (localizado no núcleo celular) forma o RNA-"mensageiro" que irá levar a informação genética ao complexo ribossômico que se localiza no retículo endoplasmático, no citoplasma celular. (Figura 4).

A síntese proteica ocorre na superfície dos ribossomos, onde as proteínas são sintetizadas de aminoácidos livres, absorvidos

TABELA 7 - Distribuição do nitrogênio no leite cru, pasteurizado e fervido

Fração Nitrogenada	Distribuição Percentual		
	Cru	Pasteurizado	Fervido
N-Total	100,0	100,0	100,0
N-caseína	78,3 ± 0,5	80,1 ± 0,6	90,5 ± 1,9
NCN	21,7 ± 0,5	19,9 ± 0,6	9,5 ± 1,9
N-soroproteína	16,2 ± 0,9	14,3 ± 0,9	3,9 ± 1,8
N-Lg	8,4 ± 1,3	6,9 ± 1,2	0,2 ± 0,2
NPN	5,5 ± 0,7	5,6 ± 0,6	5,6 ± 0,6

Em: WOLFSCHOON-POMBO et alii (74).

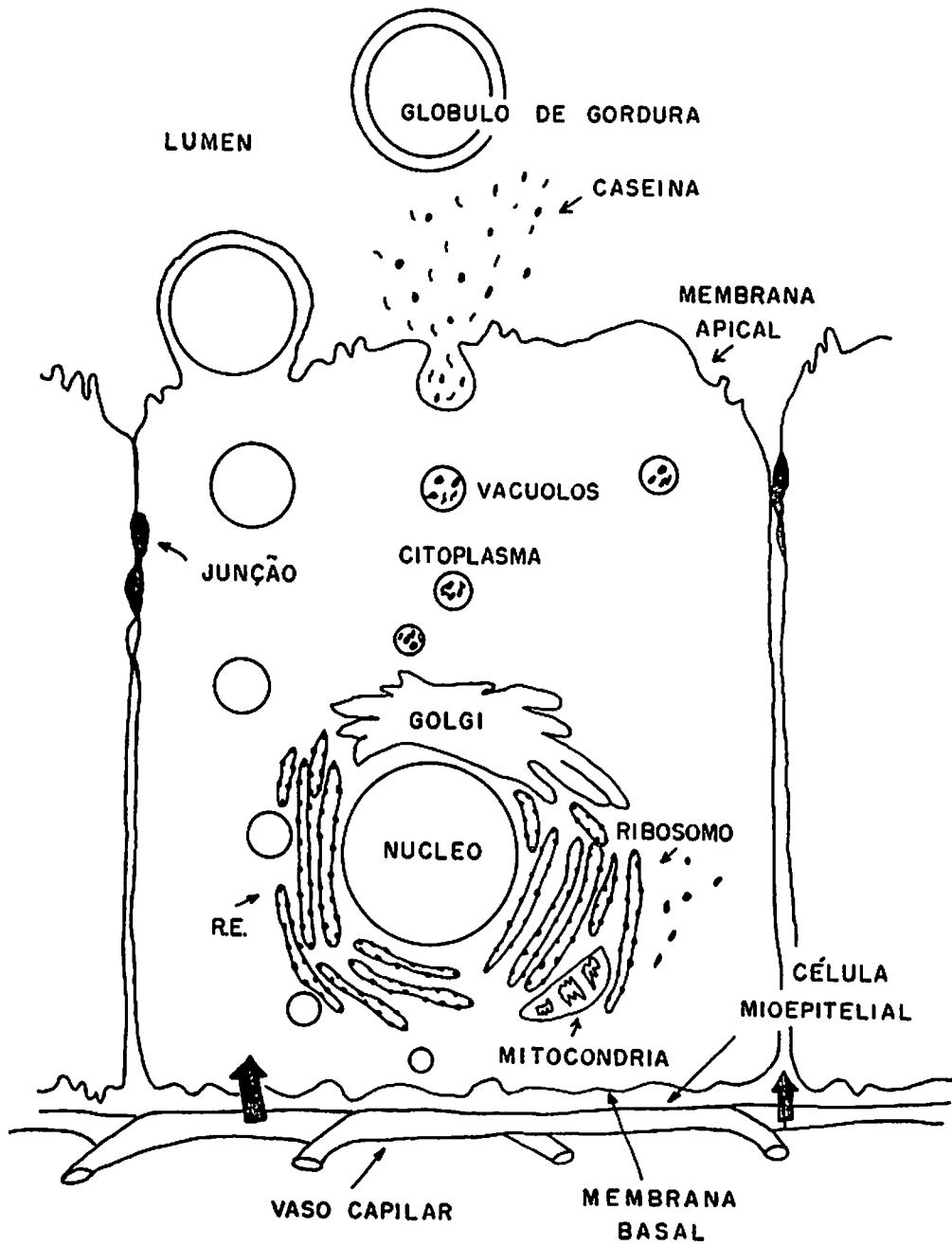
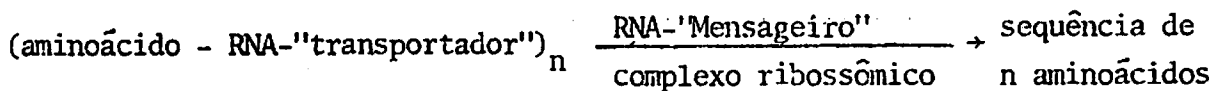


FIGURA 4 - Célula epitelial secretora (simplificada) de LARSON (32).

em sua maioria da corrente sanguínea por mecanismo de transporte a tivo. Cada aminoácido se liga a um RNA-"transportador" específico. Na superfície dos ribossomos realiza-se o intercâmbio entre o aminoácido ligado ao RNA-"transportador" e o RNA-"mensageiro", num processo denominado tradução, onde cada sequência de três nucleotídeos na cadeia do RNA-"mensageiro" (chamada "codon") codifica um aminoácido e cada RNA-"transportador" possui também uma sequência de três nucleotídeos (chamada "anti-codon"). O RNA-"transportador" é quem identificará a correta posição de cada aminoácido na cadeia peptídica a ser formada, pois na medida em que cada "codon" do RNA-"mensageiro" aparece, o aminoácido codificado é levado pelo RNA-"transportador" para a formação da cadeia polipeptídica. Em síntese teremos (Ver Figura 5).



A síntese de uma cadeia peptídica com peso molecular de 40.000 demora aproximadamente 10 segundos.

Cada cadeia polipeptídica sintetizada nos ribossomos (na forma de "pré-proteína") se desloca através do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi levando consigo extensões aminoterminais transitórias, denominadas "sinais". Estes sinais conduzem a "pré-proteína" através da membrana do retículo endoplasmático onde posteriormente sofrerá hidrólise de uma protease específica, liberando a proteína para a região de Golgi. Estes sinais precursores

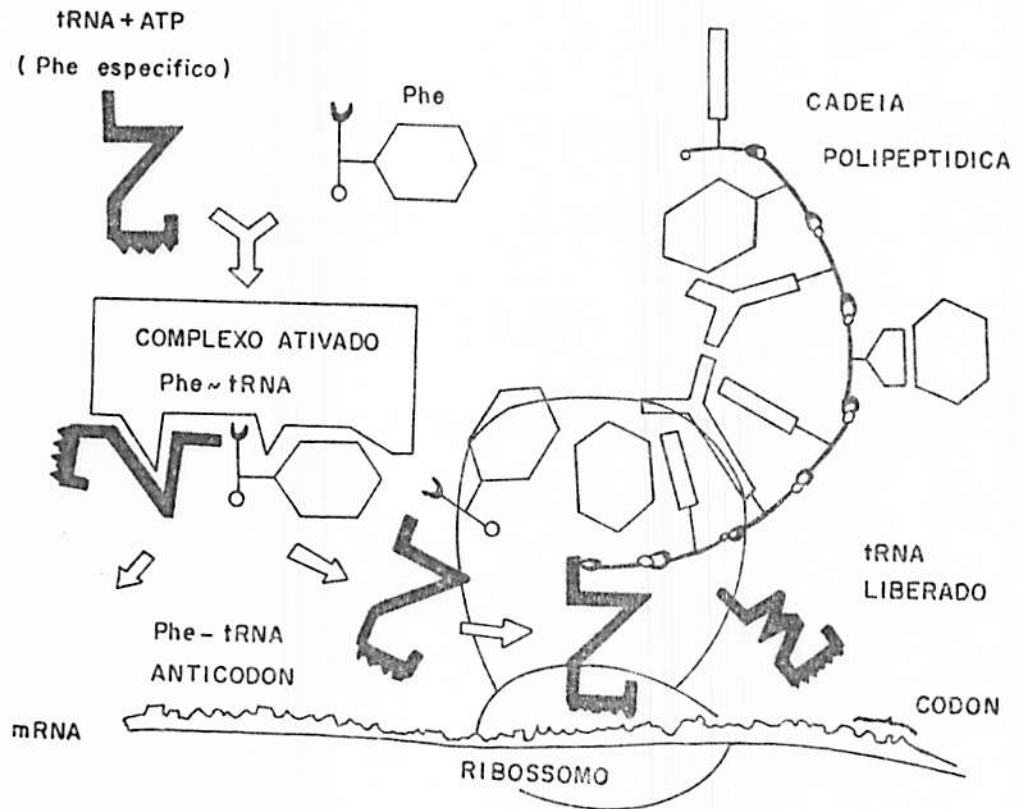


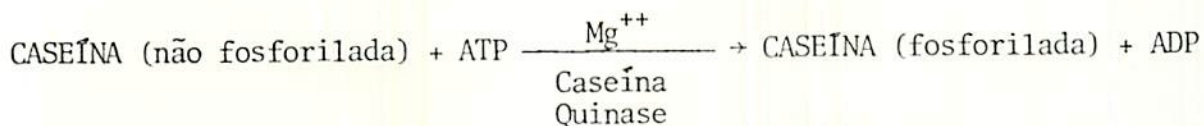
FIGURA 5 - Síntese da cadeia peptídica segundo Krüger
Em WOLFSCHOON-POMBO (66).

jã foram caracterizados e sabe-se que, no caso específico das lactoproteínas, possuem na sua porção terminal 15 aminoácidos (para α e β caseínas), 21 aminoácidos (para κ -caseína), 18 aminoácidos (para a β -lactoglobulina) e 19 aminoácidos (para a α -lactoalbumina). Todos estes resíduos começam com N-metionina, terminam com alanina e contêm predominantemente resíduos hidrofóbicos. MERCIER & GAYE (38).

Sabe-se também que as caseínas, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e lactoferrina são sintetizadas nas células alveolares epiteliais enquanto outras como a albumina do soro bovino (BSA), transferrina e imunoglobulinas IgG₁ e IgG₂ são absorvidas pelas células diretamente do sangue. Outras imunoglobulinas, IgA e IgM, se originam provavelmente das células do plasma adjacente ao epitélio secretor. WOLFSCHOON-POMBO (66).

2.7. A Fosforilação das Caseínas

A fosforilação das caseínas, especialmente nos aminoácidos serina e treonina exige uma proteína quinase. As quinases, que atuam sobre caseínas desfosforiladas (na presença de cátions bivalentes), tem sido encontradas no complexo de Golgi, e no retículo endoplasmático liso de células secretoras de leite. Somente as caseínas são fosforiladas apesar das principais soroproteínas conterem os aminoácido serina e treonina.



A caseína quinase transfere o grupo fosfato terminal de ATP aos aminoácidos.

O processo de fosforilação das caseínas ocorre após a formação das cadeias polipeptídicas e envolve o reconhecimento enzimático de certos sítios, correspondente a pequenas sequências de aminoácidos. Esta sequência é composta de três aminoácidos, sendo o primeiro obrigatoriamente representado por serina ou treonina; o segundo podendo ser um aminoácido qualquer e o terceiro um aminoácido acídico (ácido glutâmico ou aspártico, fosfoserina) (Figura 6).

Existem fatores que limitam a taxa e a extensão da fosforilação. A incorporação dos grupos fosfato depende não somente de suas propriedades intrínsecas mas também das características do sistema, como a hidrofobicidade e topografia do sítio de reconhecimento que pode ser mais ou menos susceptível à ação das caseínoquinases.

Uma sequência decrescente de potencialidade para a fosforilação seria:



Isto demonstra que os resíduos treonil e aspartil são menos efetivos como determinantes e aceptores de grupos fosfato.

A incorporação enzimática de fosfato em qualquer sítio de



Nº _____
 Casella _____
 Quilómetros _____

A casella possui um grupo fosfato terminal, de
 ALP nos aminoácidos.
 O processo de fosforilação das casellas ocorre após a for-
 mação das cadeias polipeptídicas e envolve o reconhecimento enzimá-
 tico de certos sítios, correspondente a pedras sequências de ami-
 noácidos. Esta sequência é composta de três aminoácidos, sendo o
 primeiro obrigatoriamente representado por serina ou treonina; o
 segundo podendo ser um aminoácido qualquer e o terceiro um amino-
 ácido ácido (ácido glutâmico ou aspártico, fosforilamino (Figura 6)).
 Existem fatores que limitam a taxa e a extensão da fosfori-
 lação. A incorporação dos grupos fosfato depende não somente de
 suas propriedades intrínsecas mas também das características do
 sistema, como a hidrofobicidade e topografia do sítio de reconheci-
 mento que pode ser mais ou menos suscetível à ação das casellas
 químasas.
 Uma sequência representativa de particularidades para a fosfori-
 lação seria:



Isto demonstra que os resíduos treonina e aspártico são menos sus-
 cetíveis para a fosforilação.
 A incorporação enzimática de fosfato em qualquer sítio de

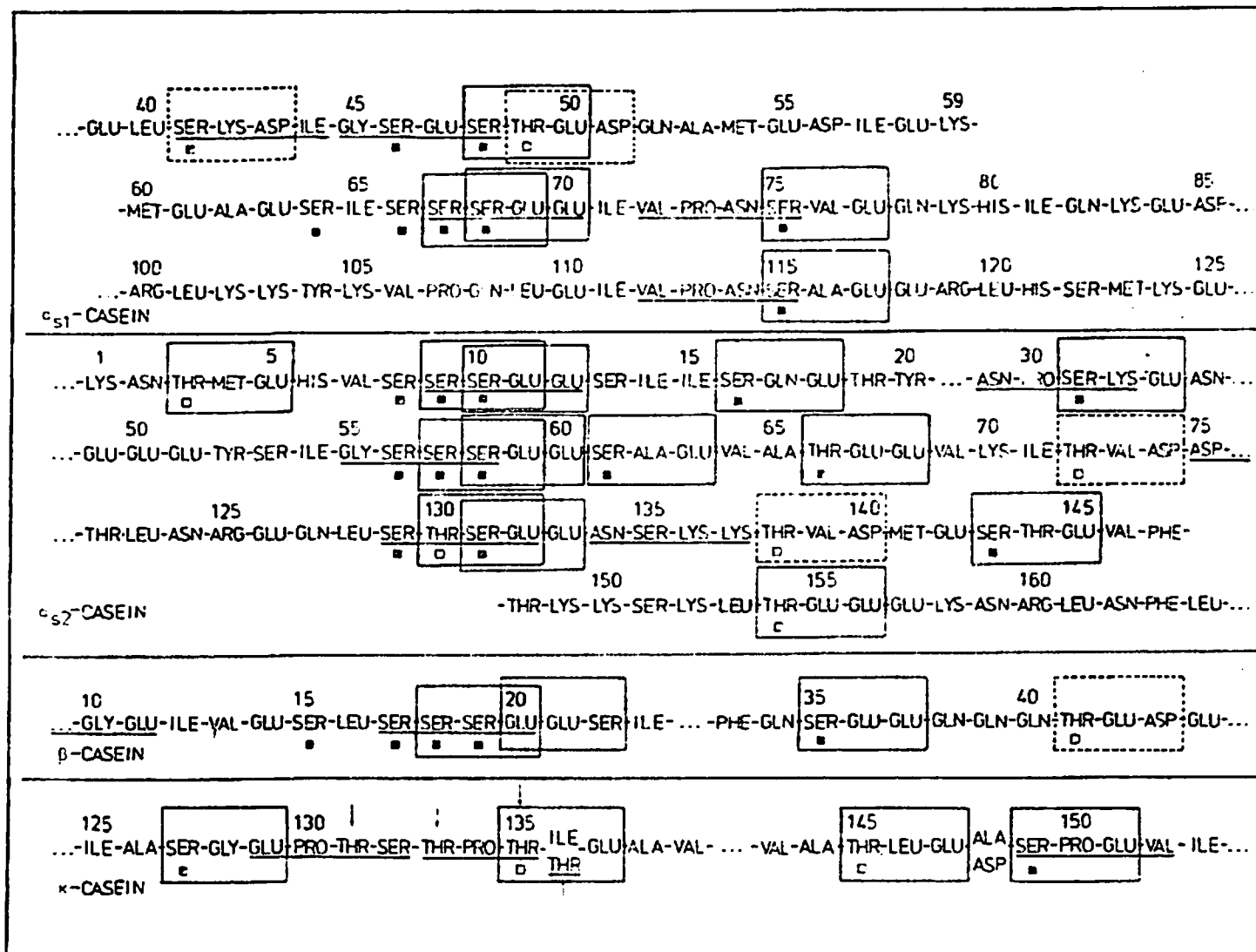


FIGURA 6 - Localização dos grupos fosfato e sítios de fosforilação em potencial na sequência de aminoácidos das caseínas.

LEGENDA: As sequências tripeptídicas assinaladas em pontilhado referem-se àquelas contendo resíduos aspartil como determinantes. Os quadros cheio, metade cheio e vazio representam, respectivamente, os resíduos de aminoácidos fosforilados em todas cadeias polipeptídicas, em algumas ou não fosforilados. Em MERCIER & GAYE (38).

reconhecimento requer que este seja acessível às caseino-quinases. Na κ -caseína, por exemplo, o fato de se ter um baixo teor em fosfato pode resultar de uma competição entre glicosiltransferases e caseino-quinase, onde a glicosilação pode prejudicar a fosforilação, ocorrendo as duas concomitantemente.

A glândula mamária sintetiza grandes quantidade de caseína (até 800 g/dia), o que gera uma concentração muito alta em relação aquela encontrada para as enzimas, as quais podem não ser capazes de incorporar fosfatos em todos os sítios do reconhecimento. Tal fato pode explicar a ocorrência de formas multifosforiladas de caseína que possuem sítios de reconhecimento mais acessíveis às caseino-quinases.

Os grupamentos fosfatos, associados ao cálcio, desempenham um importante papel na estruturação das micelas de caseína, embora o grupo fosfato da κ -caseína não seja essencial para a formação das micelas. Também parecem exercer uma função nutricional, onde caseino-fosfopéptides - os quais são mais resistentes à ação de enzimas proteolíticas e capazes de se ligar ao cálcio e outros metais - podem estar envolvidos no transporte do cálcio ou mesmo atuar como peptídeos biologicamente ativos.

2.8. A Distribuição do Fósforo

A composição salina do leite (moléculas e íons salinos presentes e suas concentrações) não é conhecida com muita precisão.

Isto ocorre devido principalmente a formação bastante comum de par de íons.

O fósforo presente no leite encontra-se distribuído nas suas diversas fases; como a coloidal, ligado às proteínas (caseínas), em emulsão, ligado aos lípidos ou em solução propriamente.

A porcentagem de fósforo (g/100 de caseína) é aproximadamente constante no leite de mistura e igual a 0,85. Deste teor, cerca de 75-80% se encontra na fração solúvel em ácido e cerca de 23% está ligado covalentemente à caseína. A Tabela 8 fornece dados sobre a distribuição e características (propriedades) do fósforo em suas várias formas no leite.

O fósforo esterificado às caseínas é o que se apresenta com distribuição mais equilibrada no leite pois sua presença é regulada pela sequência de aminoácidos da síntese proteica. Mesmo fatores naturais que alteram o teor quantitativo das caseínas, não implicam necessariamente nas mudanças do fósforo a elas esterificado, ou seja, seu teor relativo.

Em trabalho recente, MARIANI (38) confirma esta hipótese analisando leite de quatro raças diferentes onde observou:

	Raças			
	A	B	C	D
% caseína (g/100 ml)	2,56	2,65	2,68	2,78
P-caseínico (mg/100 ml)	22,4	22,8	23,2	24,8

TABELA 8 - Distribuição aproximada de fósforo no leite.

Distribuição	mg/100g	mmol	Solubilidade em TCA	Observação
<u>Fósforo Micelar (coloidal)</u>				
- Orgânico	21,6	7,0	Não	Esterificado (P-serina) à caseína
- Inorgânico	30,4	9,8	Sim	Cimentado às caseínas junto com Ca, Zn, Mg, citrato.
<u>Fósforo Solúvel</u>				
- Difundível ou Ultrafiltrável	37,8	12,2	Sim	Íons $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} e complexos Ca, Mg, Na e K.
<u>Fósforo Esterificado</u>				
- Difundível ou Ultrafiltrável	8,1	2,6	Sim	Íons glicose-1-PH, glicose -1-P ² e complexos com Ca, Mg, Na e K
- Não Difundível	2,5	0,8	Sim	-
<u>Fósforo nos Lípidos</u>				
- Fosfolípidos	1,3	0,4	Não	Formando parte da molécula do fosfolípido (fosfatidilcolina, esfingomielina, etc.).

Compilada e/ou calculada da literatura.

Observa-se que, conforme aumenta o teor em caseína do leite, aumenta também o teor em fósforo absoluto (mg/100 ml), mas não o teor relativo (gP/100g caseína) que é aproximadamente constante no leite de mistura e igual a 0,85%. No trabalho de MARIANI (35) pode-se observar em 4 raças valores entre 0,86 e 0,89%. Outros trabalhos como SCHIMIDT & BOTH (851) encontraram valores próximos (0,82%) e ainda SCHIMIDT & POLL (52) que encontraram 0,83%. A média confirmou-se estar mesmo em torno de 0,85%, com citações de WALSTRA & JENNESS (59) e HOLT (25) ambos apresentando este mesmo exato valor.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras:

Foram utilizadas as seguintes amostras para a execução do trabalho:

- Leite pasteurizado (26 amostras) do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, que foram coletadas e analisadas nos períodos de Junho/Setembro de 1987 e Janeiro/Fevereiro de 1988;

- Soro de queijo tipo Prato, Minas e Mussarela (25 amostras) coletadas no mesmo local e época;

- Amostras individuais de leite cru (05) recebidas da fazenda experimental do CNPGL/EMBRAPA;

- Leite pasteurizado do mercado de Juiz de Fora (09 amostras) compreendendo 5 marcas comercializadas na região;

- Leite em pó desnatado, amostras genuínas (19) cobrindo um ano de produção (Maio 1983/Junho 1984) recebidas da Universidade Técnica de Munique.

3.2. Pré-tratamento das Amostras.

As amostras fluidas de leite, soro e respectiva mistura fo

ram desnatadas por centrifugação a 1000G/40 min., sendo os primeiros 20 minutos à temperatura ambiente (20°C) e os últimos 20 minutos a 5°C.

As amostras desnatadas foram removidas por sucção (pipeta) através de orifício feito na linha de gordura.

3.3. Análises.

Três frações do fósforo e nitrogênio foram determinadas para estudo:

- Fosforo total (Pt); fósforo caseínico (Pcas) e fósforo solúvel em ácido tricloroacético (Ptca);

- Nitrogênio total (Nt); nitrogênio não proteico (NPN) e nitrogênio proteico (Np).

Análises de acompanhamento e controle de leite pasteurizado e soro de queijo, com relação principalmente ao seu extrato seco e à crioscopia também foram executadas. Todas as análises foram executadas em duplicata.

3.4. Métodos

3.4.1. Fósforo

O fósforo foi determinado usando o método fosfomolibdato descrito em WOLFSCHOON-POMBO et alii (76). Para a determinação do fósforo total (Pt) a amostra foi rigorosamente pesada (cerca de 2g) em cadinho, secada em estufa (100-105°C) e incinerada

em mufla (550°C/2h e 30 min.) até obter cinza branca. Resfriadas em dessecador, as cinzas foram dispensadas para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de aproximadamente 20 ml de solução de ácido sulfúrico 0,1N; quando o volume foi completado com água destilada. Pipetou-se 2 ml desta solução e transferiu-se para o balão volumétrico de 50 ml, acrescentando-se aproximadamente 20 ml de água destilada e exatamente 20 ml de reagente hidrazina-molibdato (preparado com 25 ml de sulfato de hidrazina 0,15% e 10 ml de molibdato de amônia 0,1N em solução final para 100 ml). Adicionado o reagente, completado o volume e agitado e seu conteúdo, este foi colocado em banho maria fervente por exatos 15 minutos, sendo resfriado em banho de gelo logo após. A absorvância foi medida a 700 nm geralmente após 10-30 minutos.

O fósforo solúvel em ácido (Ptca) foi determinado após pesagem rigorosa da amostra (cerca de 3g) em um becker, acrescentado o mesmo peso com água destilada morna (40°C), homogeneizado e acrescentado o mesmo peso (da amostra + água destilada morna), lentamente, de solução de ácido tricloroacético (TCA) 24%. Após decantação de 30 minutos e filtração em papel de filtro, 2 ml deste filtrado foram pipetados para um balão volumétrico de 50 ml. Completado o volume e homogeneizado, desta solução foram pipetados 5 ml para novo balão volumétrico de 50 ml, seguindo agora como descrito anteriormente (acrescentar água, reagente hidrazina-molibdato ...). O fósforo caseínico foi determinado pela diferença entre o fósforo total (Pt) e o fósforo solúvel em ácido (Ptca). O conteúdo de fósforo foi calculado em função de uma curva padrão prepara-

da à partir de solução contendo 0,4390 g/l de fosfato de hidrogênio de potássio, que fornece um padrão de 100 µg/ml de fósforo. (Ver Figura 7).

3.4.2. Nitrogênio:

A determinação do nitrogênio foi feita através do método clássico semi-micro Kjeldahl segundo normas da FIL/IDF em WOLFSCHOON-POMBO (69) após procedimentos de separação das frações. Para o nitrogênio total (Nt) a amostra foi apenas diluída (5%) em solução para se utilizar 5 ml desta para digestão.

Já no nitrogênio não proteico (NPN) a mostra sofreu precipitação com ácido tricloroacético 24% de modo que o produto final (filtrado) estivesse em concentração de 12% com ácido.

O nitrogênio não caseínico (NCN), determinado para obter o nitrogênio caseínico por diferença ($N_{cas} = N_t - NCN$), foi determinado após precipitação da caseína a pH 4,6 de acordo com método de ROWLAND, descrito por WOLFSCHOON-POMBO (69), onde 30 ml de água destilada morna (40°C) e 1 ml de ácido acético 10% são adicionados a 10 ml de solução da amostra (5ml/100ml), e após 10 min., adicionado 1 ml de acetato de sódio 1N. Assim precipitada a caseína, o volume foi completado no balão (50 ml) e após repouso de 15 min., procedeu-se à filtração (com papel de filtro). Foram utilizados 5 ml do filtrado para digestão.

As amostras de leite em pó desnatado foram reconstituídas com água destilada e analisadas para fósforo e nitrogênio como no leite fluido.

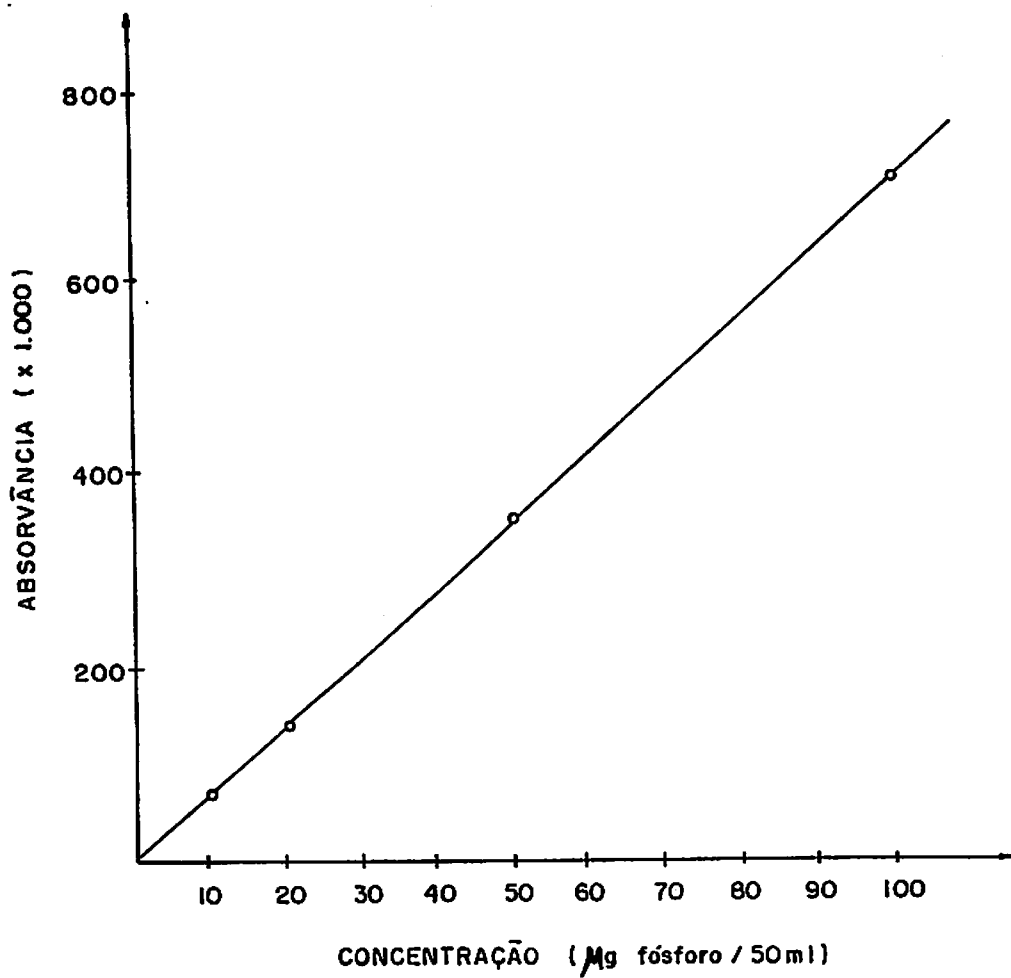


FIGURA 7 - Curva de calibração do fósforo.

3.4.3. Crioscopia e Extrato Seco:

Para maior segurança e também acompanhamento e observação as amostras de leite pasteurizado e soro de queijo foram ainda submetidas a exame crioscópico e determinação de seu extrato seco seguindo técnicas consagradas descritas pela A.P.H.A. (2) para análise de leite e derivados.

A determinação da depressão do ponto de congelamento (DPC) foi executada em crioscópio eletrônico semi-automático FUNKE-GERBER.

O extrato seco foi obtido após pesagem da amostra em cápsula com areia e evaporação em estufa 100-105°C/3 horas.

3.5. Curva Padrão

Uma curva padrão foi preparada utilizando-se valores médios de fósforo caseínico e nitrogênio proteico das amostras de soro e leite pasteurizado analisadas; em misturas hipotéticas de (0 a 100%, com intervalos de 10%).

A curva padrão foi analisada e obtido o modelo matemático pelo Setor de Informática da EMBRAPA, em Juiz de Fora - MG, utilizando o Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (pacote SAEG).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados os resultados das análises das várias frações de fósforo e nitrogênio das amostras de leite pasteurizado, soro de queijo, leite cru e leite em pó. Posteriormente serão apresentados resultados das análises de acompanhamento feitas no leite pasteurizado e soro de queijo, bem como das respectivas misturas feitas em laboratório, e de amostras de leite pasteurizado do mercado local.

4.1. Distribuição do Fósforo e Nitrogênio no Leite Pasteurizado (desnatado):

A Tabela 9 mostra a distribuição das diferentes formas de fósforo e nitrogênio no leite pasteurizado durante os meses de junho, julho e agosto de 1987 e janeiro e fevereiro de 1988.

As amostras são provenientes da usina de beneficiamento do Instituto de Laticínios Cândido Tostes em Juiz de Fora, e consideradas autênticas (genuínas).

A fração de fósforo solúvel em TCA (Ptca) compreende três sub-frações. A primeira delas seria o fósforo inorgânico coloidal,

TABELA 9 - Conteúdo (mg/100 ml) de fósforo e nitrogênio no leite pasteurizado.

	Fósforo			Nitrogênio				
	Total Solúvel em (Pt)	TCA (Ptca)	Caseínico (Pcas)	Total (Nt)	Não Proteico (NPN)	Proteico (Np)	Caseínico (Ncas)	Das Soroproteínas (Nsp)
Média	95,3	71,7	21,8	526,9	26,6	500,3	430,1	75,8
Desvio padrão	± 5,9	± 5,7	± 1,7	± 38,2	± 3,6	± 36,1	± 40,8	± 11,1
n	26	26	26	26	26	26	26	26
Percentual	100,0	76,68	23,52	100,0	5,05	94,95	81,65	14,39
C.V. (%)	6,31	7,97	7,80	7,25	21,05	7,22	9,49	16,64

que associado ao cálcio forma o "cimento" que une as submicelas de caseína entre si e cuja estrutura acredita-se ser representada por fosfato di-cálcio-di-hidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), conhecida como "brus_{hite}" SCHMIDT & BOTH (51), SCHMIDT (50). Uma segunda subfração é representada pelo fósforo inorgânico dissolvido, que inclui todas as formas (não micelares) solúveis de fosfato que ocorrem na fase aquosa do leite, especialmente como H_2PO_4^- e HPO_4^{-2} e seus respectivos complexos com cálcio, magnésio, sódio e potássio. HOLT et alii (26). A terceira sub-fração é composta por fosfoésteres solúveis como glicerol-1-PH⁻ e glicerol-1-P⁻² normalmente ligados a açúcares. Segundo WALSTRA & JENNESS (59) estas três sub-frações que compoem o fósforo solúvel em TCA (Ptca) representam 77% do fósforo total assim distribuídas:

Fósforo inorgânico coloidal	32%	} 77% de fósforo total
Fósforo inorgânico dissolvido	36%	
Fósfoésteres solúveis	9%	

Assim, a fração do fósforo solúvel em TCA apresentada na Tabela 9 e correspondente a 76,68% do fósforo total confirma os dados da literatura. Da mesma forma podemos afirmar que o fósforo caseínico (Pcas) determinado pelo método analítico proposto, representando aproximadamente 23% do fósforo total, apresenta-se em conformidade com a literatura e, em valores reais (21,8mg/100ml) muito próximo desta.

Uma segunda tabela (simplificada) da distribuição do fósforo é apresentada. Nesta são observados valores médios de várias referências. O valor encontrado para o fósforo caseínico no presen

te trabalho pode ser então melhor comparado e constatada sua proximidade.

Comprova-se também que o fósforo total (Pt) encontrado apresenta-se na média, conforme a literatura. O fósforo encontrado nos lípidos, está presente como fosfolípide na membrana do glóbulo de gordura e, segundo MULDER & WALSTRA (42) o conteúdo de fosfolípidos no leite integral e desnatado é de, respectivamente, 0,035% e 0,015%. Isto implica dizer que o conteúdo de fósforo nos fosfolípidos do leite desnatado será em torno de 0,6 mg/100 ml e não 1,3 (leite integral) considerado na Tabela 10.

Esta concentração (0,6mg/100ml) foi considerada suficientemente pequena e constante para não ser considerada na análise geral deste trabalho (uma vez que as amostras foram também desnatadas).

Quanto ao conteúdo e distribuição do nitrogênio no leite pasteurizado, observa-se que o nitrogênio total encontra-se de acordo com a média citada anteriormente na literatura. Já a distribuição entre as suas frações principais que são o nitrogênio caseínico (Ncas) e o nitrogênio das soroproteínas (Np-Ncas) indica uma relação ligeiramente diferente daquela do leite cru, no qual, normalmente, encontram-se na proporção de 80/20, respectivamente.

Podemos afirmar que o valor determinado de nitrogênio caseínico no leite pasteurizado pelo método Kjeldahl ($430,1 \pm 40,8$) representa um valor aparente e superior ao verdadeiro, devido à desnaturação das soroproteínas quando da pasteurização do leite.

TABELA 10 - Distribuição aproximada de fósforo no leite

	<u>mg/100ml</u>	<u>solúvel em TCA</u>
<u>Fósforo solúvel</u>	44,2	
inorgânico	35,6	+
em ésteres	8,6	+
<u>Fósforo coloidal</u>	50,9	
inorgânico	29,0	+
ligado à caseína	21,9	-
<u>Fósforo nos lípidos</u>	1,3	-

Valores médios das referências: WHITE & DAVIES (64); DAVIES & WHITE (16); BRUNNER (7); WALSTRA & JENNESS (59); MARIANI (35); DALGLEISH et alii (15) HOLT et alii (26).

4.2. Distribuição do Fósforo e Nitrogênio no Soro de Queijo:

As amostras de soro de queijo corresponderam à produção da mesma usina de beneficiamento, coletadas no mesmo período que o leite pasteurizado. Foram provenientes da fabricação de queijos tipos Minas, Prato e Mussarela. Maiores detalhes são apresentados na Tabela 11.

Em princípio destaca-se que pouco se conhece no Brasil à respeito da composição detalhada do soro de queijo. Lamenta-se o fato não só pela inexistência na literatura nacional de parâmetros para comparação mas pela importância do seu conhecimento devido à sua utilidade no controle da fabricação dos queijos (determinação das chamadas cifras de transição) além do que, quando não é utilizado na indústria e torna-se então um efluente desta, constitui problemas por ser contaminante (poluente) em potencial. O tratamento deste efluente poderia ser melhor realizado quando do conhecimento da sua composição.

Quanto aos resultados obtidos em relação ao conteúdo de fósforo, estes são melhor discutidos e confrontados a seguir na Tabela 12.

Em princípio, vale lembrar que ao se calcular o fósforo caseínico pela diferença entre o fósforo total e o fósforo solúvel em TCA (uma vez que os fosfolípidos foram eliminados por centrifugação) encontrou-se um valor igual a 3,6 mg/100 ml de fósforo "caseínico" no soro de queijo; cabe lembrar que as caseínas não são soroproteínas e que as soroproteínas não contêm fósforo em sua mo-

TABELA 11 - Conteúdo (mg/100 ml) de fósforo e nitrogênio no soro de queijo.

	Fósforo		Nitrogênio				
	Total (Pt)	Solúvel em (TCA)(Ptca)	Caseínico (Pcas)	Total (Nt)	Proteico Caseínico (Np)	Proteico Caseínico (Ncas)	
Média	42,0	58,4	3,6	142,0	32,5	109,7	16,0
Desvio padrão	± 1,9	± 1,5	± 1,3	± 11,7	± 5,9	± 8,1	± 6,8
n	25	25	25	25	25	25	11
Percentual	100,0	91,43	8,57	100,0	22,75	77,25	11,27
C.V. (%)	4,52	5,90	56,11	8,24	18,27	7,38	42,5

TABELA 12 - Conteúdo médio de fósforo (da literatura) de soro de queijo.

<u>Pt</u>	<u>Pcas</u>	<u>WALSTRA & JENNESS(59)</u>	<u>WONG et alii</u>	<u>JOSEPHSON et alii</u>	<u>COUSIN et alii</u>
42,0	3,6	40-55	580 ^a 430 ^b	493	430(380-490)

a - soro ácido

b - soro doce

- Obs.: 1. Os resultados deste trabalho (Pt e Pcas) são expressos em mg/100 ml e WALSTRA & JENNESS em mg/100g.
2. Resultados dos demais trabalhos são expressos em mg/kg e referem-se ao fósforo total (Pt).
3. WONG et alii e JOSEPHSON et alii estão em: COUSIN et alii (14).

lécua. Em verdade, as proteínas do soro de queijo e as soroproteínas do leite não são, por convenção, exatamente iguais. Soroproteínas de leite são definidas como o grupo de proteínas do leite que permanecem em solução após a precipitação da caseína a pH 4,6 a 20°C. As proteínas do soro de queijo são aquelas que permanecem em solução após a coagulação enzimática do leite. As proteínas do soro de queijo contém o caseinomacropeptídeo liberado mediante ação do coalho na κ -caseína, faltando-lhes alguns componentes da fração proteose-peptona que permanece associada à coalhada segundo KARMAN & VAN BOEKEL (28). O fósforo determinado no soro não deve ser então considerado como fósforo "caseínico" e sim como fósforo do caseinomacropeptídeo (que contém o único resíduo de fósforo da κ -caseína). O grande coeficiente de variação (~36%) para o fósforo "caseínico" do soro de queijo poderia ser justificado pelas diferenças sutis diárias no corte da coalhada durante a fabricação.

O fósforo total no soro de queijo deveria corresponder apenas àquela subfração que é solúvel na fase aquosa e que no leite representa aproximadamente 37% do fósforo total. No entanto, como na fabricação do queijo uma pequena parte da caseína é perdida no soro, nem todo fósforo do soro é correspondente à subfração solúvel na fase aquosa, e nele é também encontrado um percentual de fósforo orgânico. Esta transição da caseína do leite para o queijo foi determinada para o queijo tipo Edam, por ANTILA et alii (03) e igual a 95,2%. Isto implica dizer que em média, 4,8% da caseína original do leite será reencontrada no soro do queijo Edam. São desconhecidos valores em nossa literatura para os queijos Minas,

Prato ou Mussarela. Nossos resultados de fósforo total em confronto com a literatura encontram-se bem próximo de sua média (Ver Tabela 12), apesar de serem soros de queijos de diferentes fabricações. Observa-se que no trabalho de WONG et alii, citado em COUSIN et alii (14), faz-se referência também a soro ácido. O valor apresentado (580 mg/kg) está acima da média dos demais soros (doces), sendo explicado, segundo SIENKIEWICZ & RIEDEL (53) por ter o soro ácido composição mineral diferente e daí conteúdo de fósforo maior que o soro doce em função da desmineralização da caseína (remoção do fosfato de cálcio coloidal).

O nitrogênio do soro de queijo, assim como seu fósforo, ao ser comparado aos resultados da literatura existente comporta-se de forma semelhante, ou seja, apresenta-se próximo de sua média global. Em apenas dois trabalhos, de literatura nacional, foram encontrados valores para o nitrogênio de queijo tipo Minas, Prato e Mussarela. (Ver Tabela 13).

O valor de nitrogênio caseínico (igual à 16,0mg%) é similar daquele determinado por KARMAN et alii (29), de 17,9mg%. Quanto aos valores de nitrogênio total, existe também uma pequena variação devido, provavelmente, aos diversos tipos de queijos que originaram os respectivos soros analisados. Em trabalho realizado por WOLFSCHOON-POMBO & LEITE (72) com soros de queijos tipo Minas, Prato e Mussarela o valor determinado para o nitrogênio total encontra-se próximo daquele aqui determinado. Já em trabalho realizado por WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO (70), os valores de nitrogênio foram obtidos a partir dos valores de % de proteína determinada por



TABELA 13 - Conteúdo médio de nitrogênio (da literatura) de soro de queijo.

Nt	Np	Ncas	KARMAN et alii (1)	COUSIN et alii (14)	WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO (70)	WOLFSCHOON-POMBO & LEITE (72)
142,0	109,7	16,9	17,9 ^(a)	133,4 ^(b)	116,0 ^(b)	136,4 ^(b)
				14,4 ^(a)	117,6	

Notas: (a) - referem-se ao nitrogênio caseínico (Ncas) em mg% calculados do teor de caseína ÷ 6,38.

(b) - referem-se ao nitrogênio total (Nt) calculado do teor de proteína total ÷ 6,38.

titulação (método do formol) e não pelo método Kjeldahl como os demais; estes valores (% proteína) quando convertidos a nitrogênio (x 6,38) ficaram abaixo da média dos demais.

4.3. Resultados das Análises de Leite em Pó Desnatado e Leite Cru

Foram analisadas no início do trabalho 19 amostras de leite em pó desnatado genuínas (certificadas) recebidas da Universidade Técnica de Munique que cobriam toda uma extensão de produção anual (variação sazonal), de maio de 1983 até junho de 1984. No Brasil, há uma grande dificuldade de se analisar amostras genuínas e, em especial, de conseguir toda uma produção representativa de um ano. Foram, juntamente com as amostras, fornecidos dados sobre o teor em caseína (g/100g do pó) e sobre o percentual relativo de nitrogênio caseínico no nitrogênio proteico (Ncas/Np). Foram determinados nas amostras o seu teor de fósforo total (Pt), fósforo solúvel em TCA (Ptca) e calculado então o seu fósforo caseínico (Pcas) e a sua porcentagem sobre a caseína ($\frac{Pcas \times 100}{100 \text{ g caseína}}$) (FIGURA 8).

Os resultados confirmam que o teor relativo de caseína na proteína varia sazonalmente. Apesar de pequena, com média de 81,66 e coeficiente de variação de apenas 1,21%, o fato é bastante conhecido da tecnologia de queijos, sendo base para padronização do leite segundo o esquema do teor de gordura/teor de caseína. FURTADO (21). Conforme esperado, esta variação se manifestou apresen-

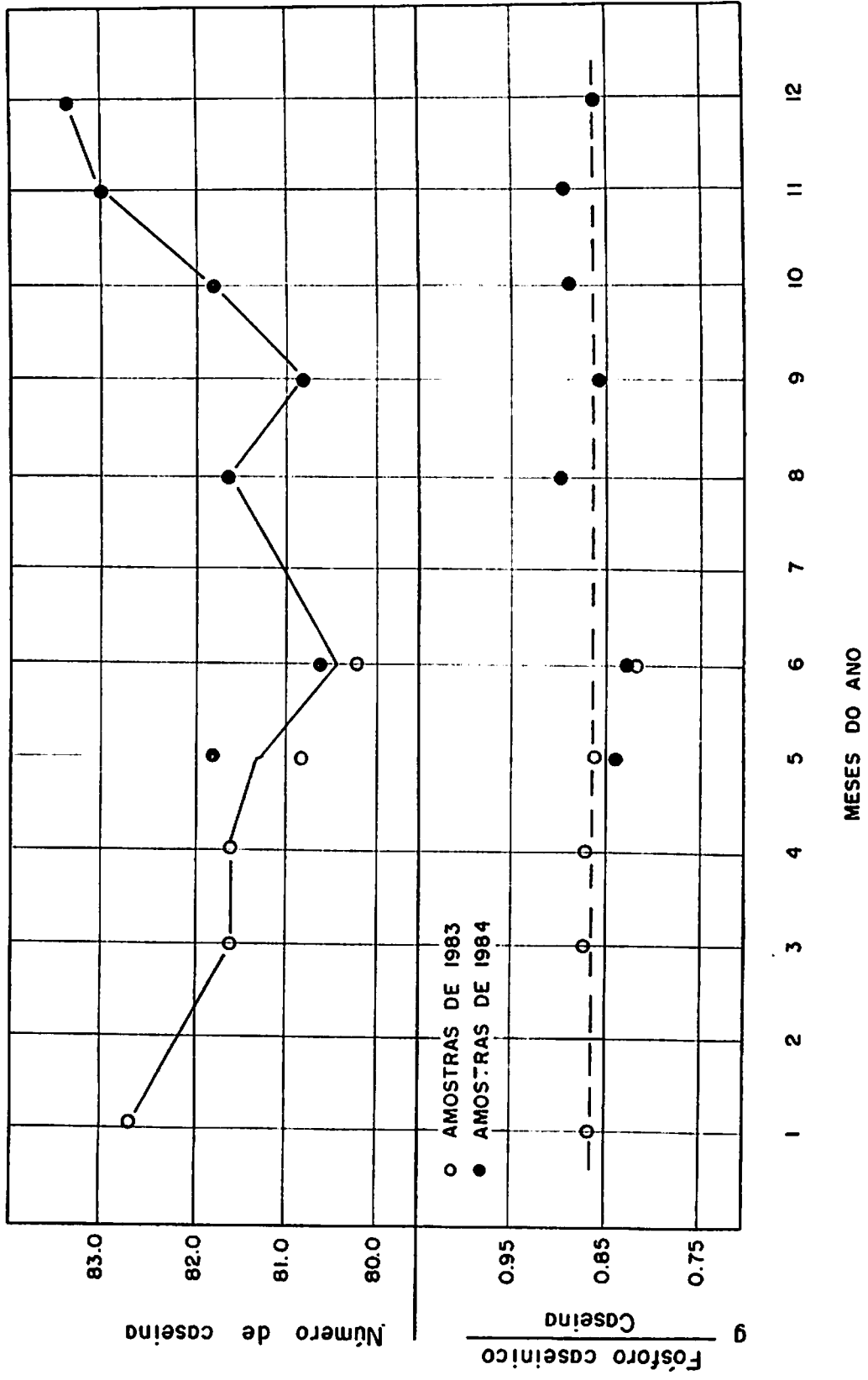


FIGURA 8 - Variação sazonal do conteúdo relativo de caseína (nº de caseína) e do fator de fósforo em amostras genuínas de leite em pó desnatado.

tando valores maiores da relação nitrogênio caseínico/nitrogênio proteico durante os primeiros meses do inverno e mais baixos valores durante os meses de verão. Como as amostras provêm de outro hemisfério (norte) é de se esperar comportamento diferente no Brasil, no entanto, a variação da relação fósforo caseínico/caseína (g/100g) deverá ser similar. Os resultados desta relação para amostras do leite em pó apresentaram uma variação muito pequena durante o ano todo, com uma média global de 0,865 e coeficiente de variação de 2,9% (Ver Figura 8).

Valores próximos foram encontrados por MARIANI (35) em 160 amostras de leite cru de 40 fazendas, representando 4 raças na Itália.

A Figura 9 mostra esta relação constante, linear do fósforo caseínico com o teor de caseína, onde a caseína e o fósforo podem naturalmente variar em números absolutos não variando entretanto seu valor relativo. Esta correlação estabelecida ($r = 0,991$) apresenta ainda o resultado encontrado neste trabalho em 5 amostras individuais de leite cru, fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite/EMBRAPA, amostras estas genuínas. Nestas amostras foi determinado um teor médio de 18,8mg/100 ml de fósforo caseínico e 2,20g/100 ml de caseína. Isto permitiu observar que, embora tenha ocorrido variações nos valores médios absolutos nas amostras analisadas (o que, de certa forma era esperado em função da origem das amostras) o valor relativo do fósforo caseínico/caseína (g/100g) foi de 0,854. O ideal seria que mais amostras de leite cru tivessem sido analisadas e, trabalhos na literatura nacional a esse respeito tivessem se desenvolvido, contudo, os resulta-

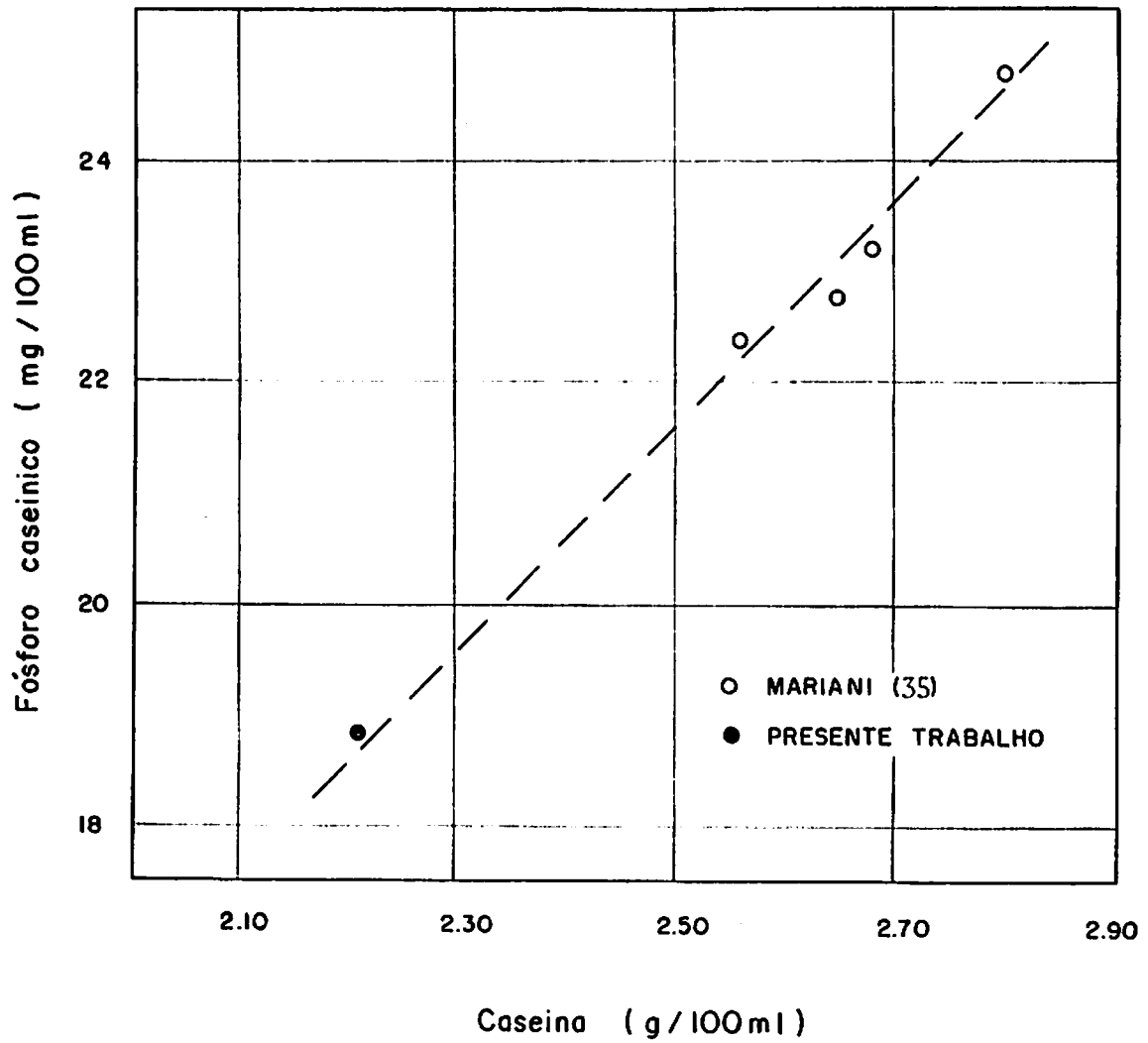


FIGURA 9 - Correlação entre o fósforo caseínico e conteúdo de caseína do leite cru.

dos se apresentaram em conformidade com a literatura existente sobretudo o trabalho de MARIANI (35) (citada no capítulo 2.8). Também em trabalhos de WHITE & DIVIES (64) para 12 amostras de leite desnatado (leite de conjunto) de um rebanho, foi determinado um valor de 0,843 g de fósforo caseínico/100g de caseína. Nos primórdios dos estudos da química de leite e derivados HAMMARSTEN, citado em WEBB et alii (62) relatou um valor de 0,85% de fósforo por caseína precipitada por ácido.

4.4. Curva Padrão

Na Tabela 14 é mostrada a correlação entre o fósforo caseínico e a porcentagem de soro de queijo em misturas hipotéticas com o leite pasteurizado.

Foram utilizados para os cálculos da Tabela 14 os valores médios para fósforo caseínico e nitrogênio proteico do leite pasteurizado e soro de queijo apresentados nas Tabelas 9 e 11.

O valor do nitrogênio caseínico apresentado na Tabela 9 (430,1 \pm 40,8) representa um valor aparente e superior ao verdadeiro, devido à desnaturação das soroproteínas quando da pasteurização do leite. Calculando-se o valor do nitrogênio caseínico pelo método proposto encontra-se o valor de 404,5 mg/100 ml que deve representar o valor verdadeiro, mostrando-se bastante próximo do equilíbrio (proporção) com o nitrogênio das soroproteínas. Este novo valor calculado fornece uma diferença daquele determinado pelo método Kjeldahl; igual a 25,6 mg/100 ml; que deve corresponder à soropro-

TABELA 14 - Correlação entre o nº de caseína e a % de soro em misturas de leite pasteurizado e soro de queijo.

% soro da Mistura	(a)		(b)	(c)	(d)
	Pcas. mg/100ml	Np mg/100ml	Ncas. mg/100ml	Número de caseína	Número de caseína
0	21,8 ^a	500,3 ^a	404,5 ^b	80,9 ^c	80,9 ^d
10	19,6	461,2	363,7	78,9	79,3
20	17,4	422,2	322,9	76,5	77,4
30	15,3	383,1	283,9	74,1	75,2
40	13,1	344,1	243,1	70,6	72,3
50	10,9	305,0	202,3	66,3	68,8
60	8,7	265,9	161,4	60,7	64,2
70	6,5	226,9	120,6	53,2	58,0
80	4,4	187,8	81,6	43,5	49,4
90	2,2	148,8	40,8	27,4	37,4
100	0	109,7	0	0	14,6

(a) = Valores médios da Tabela 9 e usando 0 (zero) para o conteúdo de fósforo caseínico (Pcas) no soro;

(b) = Calculado do Pcas. como descrito na discussão (capítulo 4.4);

(c) = Calculado como $Ncas./Np \times 100$ (Capítulo 4.4);

(d) = Como em (c), mas usando 0,86mg Pcas./100ml para 100% de soro na mistura. (explicação no parágrafo seguinte).

teína desnaturada na pasteurização, fornecendo um grau de desnaturação de 6,3%.

A escolha de um valor zero para o fósforo caseínico do soro de queijo é sustentada por argumentos teóricos e práticos.

Um conteúdo médio de nitrogênio caseínico no soro de 16mg/100ml (Tabela 11) implica em 0,86 mg de fósforo caseínico/100 ml ($0,016 \times 6,34 \times 0,85 \div 100$); este conteúdo de fósforo é então explicado pelas pequenas perdas de caseína que normalmente ocorrem durante a fabricação do queijo, que é quantificada no fósforo total (Pt) do soro mas não como fósforo solúvel em ácido (Ptca). Este também não é o fósforo do caseinomacropéptido que é também perdido no soro durante a ação do coalho na kappa-caseína; aquela fração é determinada sob o conteúdo de Ptca do soro.

Os componentes proteose-peptonas (PP) permanecem em solução como componentes nitrogenados não caseínicos a pH 4,6, mas paradoxalmente seu conteúdo de fósforo é quantificado na fração caseínica, visto que precipitam quando da adição de ácido tricloroacético (TCA) ao leite, e o $P_{cas.} = P_t - P_{tca}$. Além disso, 20% da fração PP do leite coagula com a paracaseína WALSTRA & JENNESS (59), KARMAN & VAN BOEKEL (28) durante a fabricação do queijo e, logo, o conteúdo de PP no soro doce é menor que no soro ácido. Usando dados da literatura para o conteúdo de PP (0,22 g/l) do soro doce KARMAN & VAN BOEKEL (28) e o fator Kjeldahl apropriado, segundo os mesmos autores, de 6,54, e um conteúdo médio de fósforo de 1,59 % ra as frações PP3, PP5, PP8F e PP8S segundo KILARA & SHARKASI (30), um valor de 2,2mg P/100ml pode ser calculado como a contribuição de

fósforo da PP ao fósforo caseínico (Pcas.) do soro. Portanto, aproximadamente 3,0 mg Pcas./100ml (2,2+0,86) podem ser justificados como fósforo "caseínico" do soro de queijo; a diferença (3,6mg% Pcas da Tabela 11) é certamente explicada pelo fósforo dos lípides que no leite desnatado soma aproximadamente 0,6mg/100ml como calculado anteriormente. A definição estrita de caseína exclue a proteose-peptona WALSTRA & JENNESS (59), KARMAN & VAN BOEKER (28); logo, a rigor, apenas 0,86mg P/100ml podem ser considerados como fósforo ligado a caseína nas amostras de soro de queijo. A última consideração a ser feita é que a indústria de laticínios recupera os finos de caseínas do soro de queijo, processados posteriormente portanto, e também porque as proteínas do soro não contêm fósforo, um valor zero para fósforo caseínico no soro foi usado nos cálculos teóricos.

Baseados nos dados da Tabela 14 (primeira e quinta colunas) uma curva padrão (curva 1) foi preparada; mostrada a seguir na Figura 10.

Os cálculos para a determinação da % de soro na mistura, baseados no número de caseína baseiam-se no seguinte modelo matemático:

$$x = a - by + cy^2 - dy^3 \quad \text{com } r^2 = 99,72\%$$

onde: x → % de soro na mistura

y → número de caseína

a → 100,368

c → 2.98446 . 10²

b → 9,67083.10⁻¹

d → 4,05807 . 10⁻⁴

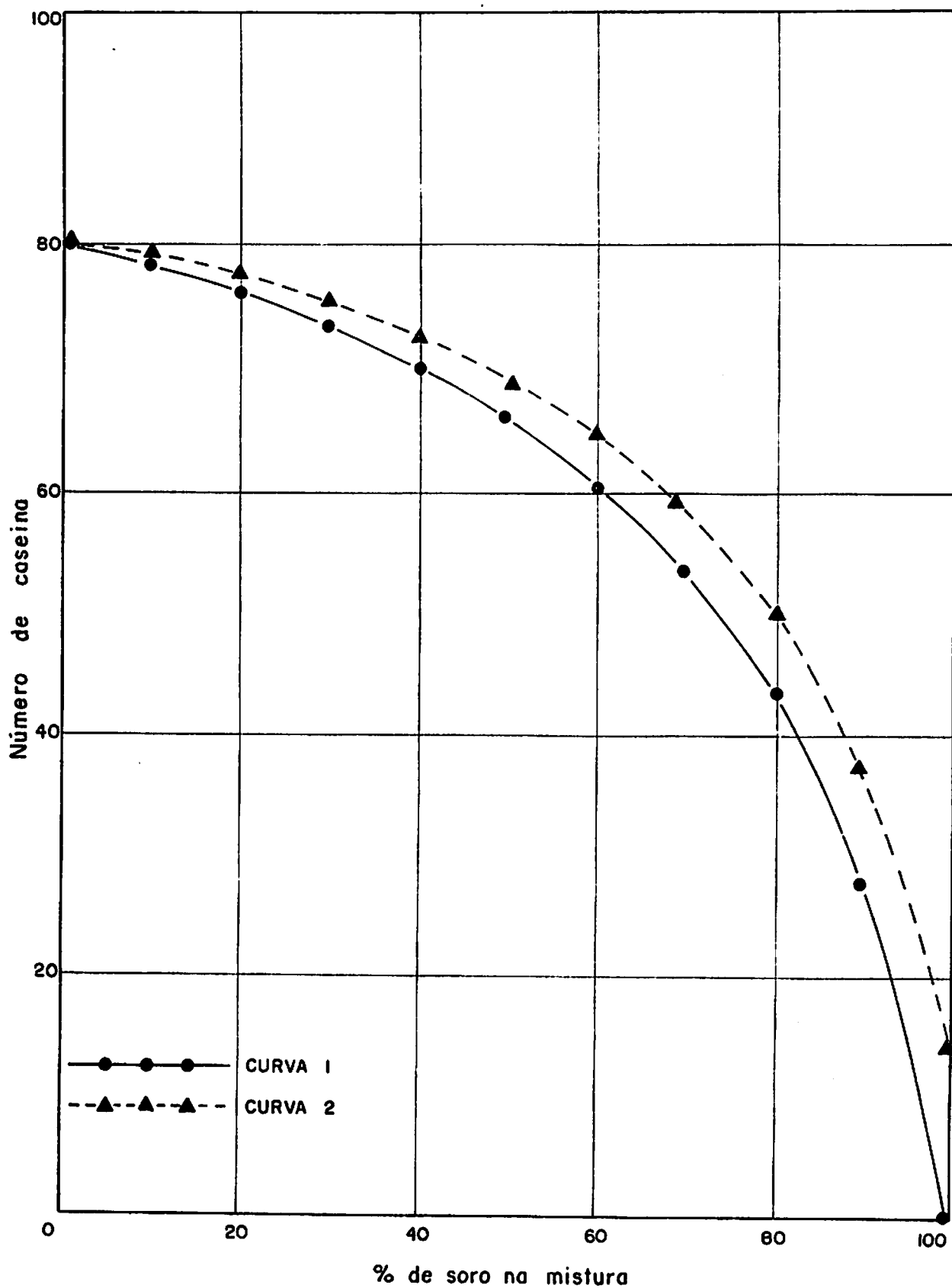


FIGURA 10 - Correlação entre o número de caseína e a porcentagem de soro na mistura de leite pasteurizado e soro de queijo.

A curva padrão foi então usada para testar o método proposto frente a misturas (feitas em laboratório) de leite pasteurizado e soro de queijo, com resultados apresentados na Tabela 15.

Os resultados confirmam que as determinações quantitativas de fósforo caseínico (Pcas) e nitrogênio proteico (Np) apresentaram-se como método efetivo para detecção da adulteração de leite pasteurizado com soro de queijo. O desvio das porcentagens estimadas frente ao valor real situou-se na faixa de -1,2 a +2,9, não sendo dependentes das porcentagens de soro de queijo na mistura.

Na Tabela 14, em sua última coluna, um outro número de caseína foi calculado assumindo o valor de 0,86mg de fósforo caseínico/100ml. Se este novo número de caseína fosse utilizado para construção de uma segunda curva padrão (curva 2, da Figura 10), as porcentagens de soro adicionado nas amostras de laboratório (5% , 10%, 20% e 30%) calculadas teriam sido 8,8%, 13,2%, 27,3% e 32,8 % e sua diferença frente ao valor real iria variar de +3,2% a +7,3%. Esta nova curva iria superestimar a porcentagem de soro das amostras. Logo, também é justificado de forma prática as discussões teóricas na elaboração da curva padrão.

4.5. Análise de Amostras de Leite Pasteurizado do Mercado Local.

As amostras desconhecidas de leite pasteurizado de marcas comerciais distribuídas na região de Juiz de Fora foram tam-

TABELA 15 - Resultado das análises de misturas laboratoriais de leite pasteurizado e soro de queijo

Nº de Misturas	% de soro de mistura	Pcas. mg/100 ml	Np mg/100 ml	Número (a) de caseína	% de soro (b) calculada	Diferença do Valor Real
1	5	21,0	490,1	79,5	7,0	+ 2,0
4	10	19,0	447,8	78,7	10,8	+ 0,8
4	20	16,6	406,6	75,8	22,9	+ 2,9
3	30	15,3	381,6	74,4	28,8	- 1,2

(a) = Calculado dos conteúdos de Pcas. e Np das misturas.

(b) = Usando a curva padrão (Figura 10).

bém analisadas conforme o método proposto. Com as determinações de fósforo caseínico (Pcas) e nitrogênio proteico (Np) calculou-se o seu número de caseína. Através da curva padrão (Figura 10) foi então obtida a porcentagem de soro para estas amostras desconhecidas. O resultado é a seguir apresentado na Tabela 16.

É evidente que em quatro das nove amostras analisadas o soro foi adicionado, justificando a urgência de uma regulamentação definitiva quanto à métodos de detecção deste tipo de fraude. Adições inferiores a 10-15% são pouco prováveis de estarem ocorrendo. De uma das indústrias de laticínios obtivemos informações extra-oficiais de que o soro de queijo foi adicionado ao nível de 15% ao leite fluido; sendo que a amostra de número 06 representa esta indústria.

4.6. Acompanhamento do Extrato Seco e Crioscopia das Amostras:

As amostras de leite cru, pasteurizado e soro de queijo que serviram de suporte ao método proposto, foram submetidas a um acompanhamento sistemático de seu extrato seco e crioscopia. Os resultados são apresentados e discutidos a seguir (Tabela 17).

O leite cru apresentou resultados próximos de literatura para extrato seco SANTOS et alii (49) (12,87) e também para a crioscopia, levando em consideração que o valor, em mili-grau centígrados igual a 526 quando convertido em graus HORVET será igual a -0,54479H, podendo ser considerado idêntico ao determinado por.

TABELA 16 - Resultado das análises de leite pasteurizado da Região de Juiz de Fora.

Amostra	Pcas. mg/100ml	Np. mg/100ml	Nº de caseína	% de soro na mistura	Data da análise
01	23,5	515,5	84,6	0	26/06/1987
02	18,3	562,9	60,3	60	26/06/1987
03	22,8	482,9	87,6	0	26/06/1987
04	18,3	500,7	69,3	43,3	23/07/1987
05	21,1	478,4	81,8	0	23/07/1987
06	22,3	533,1	77,6	16,7	04/08/1987
07	20,9	485,9	79,8	4	04/08/1987
08	19,2	509,3	70,0	41,3	04/08/1987
09	18,9	426,9	82,2	0	04/08/1987

TABELA 17 - Resultado das análises de extrato seco e crioscopia.

	Extrato seco (%)			Crioscopia (m °c)		
	média	desvio padrão	C.V.(%)	média	desvio padrão	C.V.(%)
Leite cru	12,57	± 1,22	9,7	526	± 2,9	0,6
Leite pasteu rizado	11,61	± 0,37	3,19	511	± 9	1,76
Soro de quei jo	7,02	± 0,17	2,42	520	± 17	3,27

WOLFSCHOON-POMBO (68) em 129 amostras da mesma região (-0,5444°H).

Já o leite pasteurizado, obedece aos padrões estabelecidos pelo RIISPOA onde é exigido um mínimo de 11,50% no seu extrato seco total e, levando em conta a nomenclatura referente a crioscopia, o seu resultado (511) convertido em graus Hortvet seria igual a -0,529°H, mas ainda dentro do limite de tolerância.

CASTAÑEDA et alii (13) propõe, a utilização da crioscopia como método de detecção de fraude de soro (doce) em pó no leite em pó. Analisando o método e observando a proximidade dos valores da crioscopia do leite e soro de queijo, podemos afirmar que o referido método não se aplica a amostras fluidas.

O soro de queijo apresentou crioscopia próxima à do leite justificada pelo fato de nele estarem presentes os elementos sólidos dissolvidos em solução verdadeira originários do leite, como os sais minerais e lactose, que são os responsáveis pela variação do ponto de congelamento CARVALHO (10) e WOLFSCHOON-POMBO (68). Quanto ao seu extrato seco, em trabalho com amostras de soro provenientes de queijos de fabricação similar (Prato e Minas), WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO (70) descrevem a composição do soro entre 6,75 e 6,77% de extrato seco, valores um pouco abaixo do descrito neste trabalho, possivelmente, devido a diferenças sutis da tecnologia de fabricação que vão influenciar na composição final do soro de queijo.

5. CONCLUSÕES

1. O método analítico proposto mostrou-se eficaz na detecção de soro de queijo adicionado ao leite pasteurizado, permitindo quantificar com segurança adulterações a partir de 10%;
2. Os efeitos da temperatura em condições normais de pasteurização não afetam o método, uma vez que a desnaturação das proteínas pelo calor não impede a exata determinação da relação entre o nitrogênio caseínico e o nitrogênio proteico;
3. O método não requer equipamentos sofisticados ou técnicos altamente especializados, possibilitando sua utilização em órgãos públicos de controle de qualidade e pesquisa, universidades, centros de pesquisa e escola técnicas;
4. Poderá eventualmente, ter aplicação potencial também a outros produtos lácteos, pois possibilita determinar, através do fósforo caseínico, o valor exato de caseína na amostra.

6. RESUMO

O trabalho descreve um novo método para determinar adulterações do leite pasteurizado pela incorporação de soro de queijo. A determinação quantitativa foi baseada na redução do conteúdo relativo das caseínas, no leite adulterado, devido ao deslocamento da relação do nitrogênio-soroproteínico/nitrogênio caseínico, que, no leite integral autêntico, apresenta o valor de 20/80. O fósforo caseínico e o nitrogênio proteico foram também determinados. Tendo como base o valor médio do conteúdo de fósforo caseínico de 0,85 g/100 g de caseína e o fator Kjeldahl de 6,34 g de proteína/g de nitrogênio o número de caseína foi estimado. Uma curva padrão, destinada a relacionar o número de caseína com a porcentagem de soro adicionado, foi construída utilizando-se dados médios de 25 amostras de soro de queijo, e 26 amostras genuínas de leite pasteurizado, demonstrando um conteúdo médio de fósforo caseínico de 21,8mg/100g e um valor médio para o número de caseína em 80,9%. A curva padrão, após ser testada através de uma série de amostras adulteradas em laboratório (5, 10, 20 e 30% de soro incorporado) apresentou valores variando entre os limites de -1,2 e +2,9% de desvio do valor médio real. Uma série de testes foram aplicados às

amostras de leite pasteurizado comercializadas no mercado local. Dentre estas amostras, quatro entre nove apresentaram-se claramente adulteradas com soro de queijo. Neste trabalho, demonstrou-se que o método proposto permite determinar adulterações quantitativas de leite pasteurizado pela incorporação do soro de queijo a níveis percentuais de 10% ou mais.

7. SUMMARY

The work describes a new method determining the pasteurized milk adulteration with rennet whey. The quantitative determination of whey was based on the relative casein content decrement in the adulterated milk due to a drift of the serum-protein-nitrogen/casein-nitrogen ratio which presents an expected value of 20/80 in authentic whole milk. The casein-bound phosphorus and the protein nitrogen were also determined. Based on the average casein-bound phosphorus content of 0.85g/100g of casein, on a Kjeldahl factor of 6.34g of protein/g of nitrogen the casein number was estimated. A standard curve relationship of casein number against added adulterant whey in percentage was graphed using average results from 25 cheese whey samples and 26 authentic pasteurized milk sample showing casein-bound phosphorus average of 21.8mg/100g and an average casein number of 80.9%. The standard curve, after being tested for laboratory adulterated samples (5%, 10%, 20% and 30% added whey), presented values varying within the limits of -1.2 and +2.9% deviation of the real average value. Samples of pasteurized milk sold in the local market were tested and the results showed that four out of nine samples analysed were clearly

adulterated with cheese whey. The proposed method quantitatively detected pasteurized milk adulterated with rennet whey at any adulteration levels of 10% or more.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALAIS, C. Ciência de la Leche - Principios de Técnicas Lechera. 4ª Edição. Ed. Reverté, Barcelona, 873p., 1985
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. APHA, 14 ed., N.York, 1978
3. ANTILA, V, M HAKKARAINEN, H.; LAPPALAINEN, R. The transfer of milk components to Finnish Edam and Emmental cheeses. Milchwiss., 37(6):321-324, 1982
4. BASCH, J.J.; DOUGLAS Jr., F.W.; PROCINO, L.G.; HOLSINGER, V.H. & FARREL Jr., H.M. Quantification of Caseins and Whey Proteins of Processed Milks and Whey Protein Concentrates, Application of Gel Electrophoresis, and Comparison with Harland- Ashworth Procedure. Journal of Dairy Science, 68:23-31, 1985
5. BRASIL, Ministério da Agricultura - Regulamento de Inspe-

ção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal - RIISPOA, Dec.30691 de 29/03/52 e Dec. 1259 de 25/06/72

6. BRULE, G. Les Mineraux du Lait. Revue Laitiere Française , (400):61-65, 1981
7. BRUNNER, J.R. Cow Milk Proteins: Twenty-Five Years of Progress. J.Dairy Science, 64(6):1038-1054, 1981
8. BRUNNER, J.R. Principles of Food Science, Food Chemistry. Ed. Marcel Dekker, 1976
9. CAL-VIDAL, J. Ultrafiltração de soro láctico e aproveitamento de seus componentes. Rev. do ILCT, 34(203):23-24, 1979
10. CARVALHO, I.C.de. Crioscopia do leite. Anais do IV Congresso Nacional de Laticínios, Juiz de Fora, :161-170 , 1977
11. CARVALHO, I.C.de. Fatores que afetam a estabilidade térmica do leite - 1ª Parte. Rev. do ILCT, 32(190):7-14,1977
12. CARVALHO, I,C,de. & HUHN, S. Distribuição de nitrogênio no leite e índice de caseína. Rev. do ILCT, 14(201):19-28, 1979

13. CASTAÑEDA, R.; FERNÁNDEZ, G.; CALÓ, M. & PASQUALINI, A.
Cryoscopic method for detection and estimation of rennet whey total solids in whole and skim milk powders. Netherlands Milk and Dairy Journal, 41:69-79, 1987
14. COUSIN, E.; COLLOMB, M.; LAVANCHY, P.; SIEBER, R.; STEIGER, B. & BLANC, B. Étude comparative de la composition de différents petits-laits d'origine suisse. Schweiz, Milch. Forschung, 12:73-76, 1983
15. DALGLEISH, D.G.; POULIOT, Y. & PAQUIN, P. Studies on the heat stability of milk - I. Behaviour of divalent Cations and phosphate in milks heated in a stainless steel system. Journal of Dairy Research, 54:29-37, 1987
16. DAVIES, D.T. & WHITE, J.C.D. The use of ultrafiltration and dialysis in isolating the aqueous phase of milk and in determining the partition of milk constituents between the aqueous and dispersed phases. Journal of Dairy Research, 27:171-190, 1960
17. DE KONING, P.J. & VAN ROOIJEN, P.J. Estimation of whey proteins in casein co-precipitate or in mixtures with milk powder by the use of a modified ninhydrin reaction. Milchwissenschaft, 26(1):1-6, 1971
18. DE KONING, P.J.; VAN ROOIJEN, P.J. & DRAAISMA, J.TH.M. An

- improved manual method for the determination of the cystine plus cysteine content of protein. Milchwissenschaft, 31(5):261-263, 1976
19. DE KONING, P.J.; EISSES, J. & DE VRIES, H. A method for the determination of small percentages of whey powder in milk poudres. Netherlands Milk and Dairy Journal, 20:204-212, 1966
 20. FOX, P.F. Heat-Induced Changes in Milk Preceding Coagulation, Journal of Dairy Science, 64(11):2127-2137, 1981
 21. FURTADO, M.M. Tecnologia de fabricação de queijos. Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 1976
 22. GREENBERG, R. & DOWER, H.J. Detection of Added Whey Protein Concentrate in Nonfat Dry Milk by Amino Acid Analysis. Journal of Agriculture Food Chemistry, 34:30-32, 1986
 23. HAYET, J.L. Recherches sur l'origine de la présence de lactoserum dans les poudres de lait. Technicien du Lait, (20:30-35, 1984
 24. HILL, S.D.; RICHTER, R.L. & DILL, C.W. A Sulfur-based Method to Detect Adulteration of Nonfat Dry Milk with Whey. Cultured Dairy Products Journal, 22:14-18, 1988
 25. HOLT, C. The Milk Salts: Their secretion, concentrations

- and Physical Chemistry. Development on Dairy Chemistry-
3. Elsevier Applied Science Publishers, 143-175, 1985
26. HOLT, C.; DALGLEISH, D.G. & JENNESS, R. Calculation of the ion equilibria in milk diffusate and comparison with experiment. Anal. Biochem., 113:154-163, 1981
27. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the total nitrogen content of milk by the Kjeldahl method. Norma FIL/IDF 20, 1962
28. KARMAN, A.H. & VAN BOEKEL, M.A.J.S. Evaluation of the Kjeldahl factor for conversion of the nitrogen content of milk and milk products to protein content. Netherlands Milk and Dairy Journal, 40:315-336, 1986
29. KARMAN, A.H.; VAN BOEKEL, M.A.J.S. & ARENTSEN-STASSE, A.P. A simple and rapid method to determine the casein content of milk by infrared spectrophotometry. Netherlands Milk and Dairy Journal, 41:175-187, 1987
30. KILARA, A. & SHARKASI, T.Y. Effects of Temperature on food protein and its implications on functional properties. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 23(4):323-395, 1985
31. KOSIKOWSKI, F.V. Utilisation du lactosérum et produits à base de lactosérum. Rev. Laitière Française, (372): 11-21, 1979

32. LARSON, B.L. Biosynthesis and secretion of milk proteins: a review. J.Dairy Research, 46(2):161-174, 1979
33. LECHNER, E. & KLOSTERMEYER, H. Nachweis einer Verfälschung von Magermilchpulver mit Molkenpulver (polarographische Methode). Milchwissenschaft, 36(5):267-70, 1981
34. LOKO, R. A propos de la recherche de lactosérum dans les poudres du lait. La Technique Laitiere, (964):23-27, 1982
35. MARIANI, P. Osservazioni sul contenuto e la ripartizione dei principali costituenti del sistema micellace del latte in quattro razze bovine. Annali Fac. Med. Veter., Univ. Parma, 5:173-183, 1985
36. MAXWELL, R.J.; MONDIMORE, D. & TOBIAS, J. Rapid Method for the Quantitative Extration and Simultanneous Class Separation of Milk Lipids. J. Dairy Science., 69(2):321-325, 1986
37. MEHRENS, H.A. & REIMERDES, E.H. Detection of whey in foods using the κ -casein macropeptide. GTT. Fachz. Lab., 30(5):406-409, 1986
38. MERCIER, J.C. & GAYE, P. Biochemistry of Lactation. Ed. T.B. Mephan, 1983
39. McMAHON, D.J. & BROWN, R.J. Composition, Structure, and

Integrity of Casein Micelles: A Review. Journal of Dairy Science, 67(3):

40. MODLER, H.W. Functional Properties of Nonfat Dairy Ingredients - A Review. Modification of Products Containing Casein. Journal of Dairy Science, 68(9):2195-2205, 1985
41. MROWETZ, Z. & KLOSTERMEYER, H. Polarographische Bestimmung des Molken Proteinanteiles in Milchpulvern. Milchwissenschaft, 31(6):346-349, 1976
42. MULDER, H. & WALSTRA, P. The milk fat globule. Centre of Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen . 1974
43. NEVILLE, M.C. & PEAKER, M. The Secretion of Calcium and Phosphorus into Milk. Journal of Physiol., 290:59-67, 1979
44. OLIEMAN, C. & VAN DEN BEDEM, J.W. A sensitive HPLC-method of detecting and estimating rennet whey total solids in skim milk powder. Netherlands Milk and Dairy Journal, 37(1):27-36, 1983
45. PIERRE, A. & BRULE, G. Mineral and protein equilibria between the colloidal and soluble phases of milk at low temperature. Journal of Dairy Research, 48(417-428), 1981
46. POTGIETER, C.M. The Detection of Added Whey Powder in Milk

- Powder - 1. Investigation into the application of the free sialic method recommended by the European Economic Community. South African Journal of Dairy Technology, 17 (2):55.58, 1985
47. POTGIETER, C.M. The Detection of Added Whey Powder in Milk Powder - 2. The influence of residual amounts of lactose on the determination of whey powder in milk powder by means of the free sialic acid method. Dairy Science Abstracts, 49(4) n° 2468, 1987
48. RAMPILLI, M.; RESMINI, P.; TRIPICIANO, C. & SADINI, V. Ricerca di siero presamico nelle polveri di latte e latticello - Nota II: Controllo del latte destinato all'ammasso pubblico. Scienza e Tecnica Lattiero-Casaria, 36 (1):28-45, 1985
49. SANTOS, E.C.dos.; HAJDENWURCEL, J.R. & VILELA, M.A.P. Influência sazonal na composição de alguns constituintes do leite da bacia leiteira de Juiz de Juiz de Fora. Rev do ILCT, 36(219):3-9, 1981
50. SCHMIDT, D.G. Colloidal aspects of casein. Netherlands Milk and Dairy Journal, 34:42-64, 1980
51. SCHMIDT, D.G. & BOTH, P. Studies on the precipitation of calcium phosphate. I. Experiments in the pH range 5,3 to 6,8 at 25°C and 50°C in the absence of additives.

Netherlands Milk and Dairy Journal, 41:105-120, 1987

52. SCHMIDT, D.G. & POLL, J.K. Properties of artificial casein micelles - 4. Influence of de phosphorylation and phosphorylation of the casein. Netherlands Milk and Dairy, 43: 53-62, 1989
53. SIENKIEWICZ, T. & RIEDEL, C.L. Molke und Malkeverwertung, Fach. Leipzig, 1986
54. VAN HOOYDONK, A.C.M. & OLIEMAN, C. A rapid and sensitive high-performance liquid chromatography method of following the action of chymosin in milk. Netherlands Milk Dairy J., 36(2):153-158, 1982
55. VIEIRA, S.D.A. & NEVES, B.S. Elaboração de bebidas ácidas e achocolatadas a partir de soro de queijo ultrafiltrado. Alimentação (agosto):21-25, 1985
56. VILELA, S.C. Detección de suero de quesería agregado a leche pasteurizada y leche en polvo. Determinación del glicomacropéptido por electrophoresis. Tese de Mestrado. Universidad Austral de Chile, Stp., 1987
57. VISSER, S. Proteolytic enzymes and their action on milk proteins - A review. Netherlands Milk and Dairy Journal, 35 (1):65-68, 1981

58. WALSTRA, P. & DE GRAAF, J.J. Note on the determination of the phospholipid content of milk products. Netherlands Milk and Dairy Journal, (16):283-287, 1962
59. WALSTRA, P. & JENNESS, R. Dairy Chemistry and Physics. John Wiley and Sons, New York, USA, 467p., 1984
60. WALSTRA, P. & VAN VLIET, T. Physical chemistry of Curd Making. Neth. Milk and Dairy Journal, 40(2/3):241-59,1986
61. WARREN, L. The thiobarbituric acid assay of sialic acid . Journal of Biological Chemistry, (234):1971, 1959
62. WEBB, B.H.; JOHNSON, A.H. & ALFORD, J.A. Fundamentals of Dairy Chemistry, 2ª edição, The AVI Publishing Co.Inc., Westport, Connecticut, USA, 1974, 929 p.
63. WEST, D.W. Structure and function of the phosphorylated residues of casein. Journal of Dairy Research, 53: 333-352, 1986
64. WHITE, J.C.D. & DAVIES, D.T. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex. J.Dairy Research, 25:236-255, 1958
65. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Adição de soro ao leite em pó - método de detecção. Rev. do ILCT, 39(234):3-10, 1984

66. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Biossíntese e composição do leite. I-Lactoproteínas. Palestra em Seminário na ESAL, em 12 de setembro de 1984
67. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Considerações à respeito da fervura doméstica do leite. Informe Agropecuário, 10(115):48-52, 1984
68. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Crioscopia e qualidade do leite - Aspecto de legislação. Rev. do ILCT, 40 (240):31-35, 1985
69. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Nota sobre o método semi-micro Kjeldahl. Rev. do ILCT, 35(209):39-40, 1980
70. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. & FURTADO, M.M. Nota prévia: Composição dos soros de queijo Prato e Minas. Rev. do ILCT, 32 (194):21-23, 1977
71. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. & KLOSTERMEYER, H. Indoxylsulfate in milk. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 182:103-106, 1986
72. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. & LEITE, E.A. A titulação de formal: Método rápido para determinação de proteínas no soro. Rev. do ILCT, 32(193):3-6, 1977.
73. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. & PINTO, A.P.E.de F. A qualitative method for the detection of rennet whey in milk. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 5(2) 111-115, 1985

74. WOLFSCHOON-POMBO, A.F.;, FERNANDES, R.M.; GRANZINOLLI, G. G.M. Efeitos da pasteurização - HTST e a fervura doméstica sobre a proteína do leite. Rev. do ILCT, 37(223): 3-7, 1982
75. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. & KLOSTERMEYER, H.; BUCHBERGER, J. Sobre a crioscopia do leite. Rev. do ILCT, 41(246):3-9, 1986
76. WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; SOBRAL, M.L. & COSTA, D.L.S.da. Diferenciação analítica entre Doce de Leite e Doce de Leite. Rev. do ILCT, 40(242):87-92, 1985.