

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA

Laryssa Ramos Pereira

**Caracterização das frações proteicas de produtos lácteos por *Kjeldahl* e
eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Juiz de Fora

2026

Laryssa Ramos Pereira

Caracterização das frações proteicas de produtos lácteos por *Kjeldahl* e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Stephani

Juiz de Fora

2026

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ramos Pereira, Laryssa.

Caracterização das frações proteicas de produtos lácteos por Kjeldahl e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) / Laryssa Ramos Pereira. -- 2026.

65 f.

Orientador: Rodrigo Stephani

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2026.

1. Frações proteicas. 2. Produtos lácteos concentrados. 3. Kjeldahl. 4. SDS-PAGE. 5. Processamento térmico. I. Stephani, Rodrigo, orient. II. Título.

Laryssa Ramos Pereira

Caracterização das frações proteicas de produtos lácteos por Kjeldahl e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Stephani - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Renata Luz Martins

Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Alexandre Cuin

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 24/02/2026.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Stephani, Professor(a)**, em 25/02/2026, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Cuin, Professor(a)**, em 25/02/2026, às 11:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Luz Martins, Usuário Externo**, em 03/03/2026, às 19:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2886616** e o código CRC **7B7628EB**.

Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais e familiares por todo suporte e força, sendo minha base para continuar. E aos meus amigos por todo companheirismo e ajuda durante a caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar a oportunidade e força para concluir a pós-graduação.

Aos meus pais, Cátia e Marcos, por confiarem em mim, me derem amor e suporte para seguir o caminho que escolhi, me incentivando e acolhendo.

Aos meus avós, Cleia, Rodolpho (*in memoriam*), Paulina (*in memoriam*) e João (*in memoriam*), que estiveram presentes em grandes momentos da minha vida, sinto o amor de vocês comigo.

A minha tia, Janete (*in memoriam*), por me ajudar financeiramente em todas as etapas da minha formação, até mesmo após sua partida.

Aos demais familiares, por estarem sempre por perto, dando apoio e alegria para os dias bons e também nos difíceis.

Aos meus amigos de laboratório, Igor, Paola, Letícia Zemko, Giovana Soli, Luísa, Giovana Braga, Fernanda, João e Gabriel, que dividiram comigo muito conhecimento e experiências nesses dois anos, dando suporte em cada etapa, entre as análises e a defesa.

A minha amiga Natália Alves, que sempre me acolheu, me ensinou com todo carinho e me deu suporte para que eu pudesse chegar até aqui.

A minha amiga Kamilla e Letícia Campos, pela amizade, pelo companheirismo de sempre, pelas quase 24 horas por dia que passamos juntas, entre as análises e os bons papos nas horas vagas.

Ao meu orientador, Rodrigo Stephani, que me deu essa oportunidade e suporte, mostrando que eu poderia chegar onde cheguei.

A banca, Alexandre Cuin, Renata Luz e Elisângela Ramieres, por aceitarem o convite e se disponibilizarem para agregar em meu trabalho.

A Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo espaço de pesquisa e a formação.

E aos órgãos de fomento, CAPES, CNPQ e FAPEMIG, por proporcionarem à bolsa para a realização da pesquisa.

RESUMO

Esta dissertação, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), investigou as frações proteicas de produtos lácteos concentrados por diferentes metodologias analíticas, tendo como matrizes o leite condensado integral, o doce de leite tradicional e a mistura láctea condensada.

Na primeira etapa do trabalho, objetivou-se estabelecer e otimizar as condições analíticas do método de *Kjeldahl* para a determinação de proteínas em amostras de doce de leite tradicional e leite condensado integral. Na segunda etapa, foram avaliadas as frações nitrogenadas por *Kjeldahl* e o perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de amostras comerciais de doce de leite tradicional, leite condensado integral e leite cru. Na terceira etapa, ampliou-se o número de amostras comerciais analisadas, incluindo misturas lácteas condensadas, com o intuito de avaliar a variabilidade do comportamento proteico entre marcas. Por fim, na quarta etapa, foram produzidas, em laboratório, amostras semelhantes às comerciais, visando comparar os perfis obtidos e compreender o comportamento das frações proteicas em matrizes lácteas concentradas sob condições controladas de processamento.

De forma geral, os resultados permitiram um melhor entendimento do comportamento das frações proteicas em produtos lácteos concentrados, evidenciando que metodologias de fracionamento proteico originalmente descritas para leite cru não são plenamente adaptáveis a amostras submetidas a tratamentos térmicos e processos de concentração. Adicionalmente, observou-se que as frações proteicas obtidas após o processamento térmico não correspondem a frações puras, porém podem ser utilizadas como indicativas do grau de processamento térmico ao qual os produtos foram submetidos. Verificou-se, ainda, que o comportamento das frações proteicas das amostras produzidas em laboratório foi semelhante ao observado nas amostras comerciais. O método *Kjeldahl* e a técnica de SDS-PAGE mostraram-se complementares e fundamentais para a caracterização proteica das diferentes matrizes avaliadas.

Palavras-chave: Frações proteicas; Produtos lácteos concentrados; *Kjeldahl*, SDS-PAGE; Processamento térmico.

ABSTRACT

This dissertation, developed within the Graduate Program in Chemistry at the Federal University of Juiz de Fora (UFJF) and funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), investigated the protein fractions of concentrated dairy products using different analytical methodologies, with whole condensed milk, traditional dulce de leche, and condensed dairy blend as the studied matrices.

In the first stage of the study, the analytical conditions of the *Kjeldahl* method were established and optimized for protein determination in traditional dulce de leche and whole condensed milk samples. In the second stage, nitrogen fractions determined by *Kjeldahl* and protein profiles obtained by polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) were evaluated in commercial samples of traditional dulce de leche, whole condensed milk, and raw milk. In the third stage, the number of commercial samples analyzed was expanded, including condensed dairy blends, in order to assess the variability in protein behavior among brands. Finally, in the fourth stage, laboratory-scale samples similar to the commercial products were produced to compare the obtained profiles and to better understand the behavior of protein fractions in concentrated dairy matrices under controlled processing conditions.

Overall, the results provided a better understanding of the behavior of protein fractions in concentrated dairy products, demonstrating that protein fractionation methodologies originally described for raw milk are not fully adaptable to samples subjected to thermal treatments and concentration processes. In addition, the protein fractions obtained after thermal processing do not correspond to pure fractions but can be used as indicators of the degree of thermal processing to which the products were subjected. Furthermore, the behavior of protein fractions in laboratory-produced samples was similar to that observed in commercial samples. The *Kjeldahl* method and the SDS-PAGE technique proved to be complementary and fundamental for the protein characterization of the different matrices evaluated.

Keywords: Protein fraction; Concentrated dairy products; *Kjeldahl*; SDS-PAGE; Thermal processing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Representação das micelas de caseína proposto por Walstra.....	12
Figura 2	- Estrutura tridimensional cristalográfica da β -lactoglobulina bovina (isoforma A), obtida por difração de raios X (resolução 2,0 Å). Estrutura depositada no Protein Data Bank sob o código PDB: 1QG5.	13
Figura 3	- Esquema de separação eletroforética de proteínas em um gel de poliacrilamida.	18
Figura 4	- Efeito do SDS na conformação e carga de uma proteína.	19
Figura 5	- Redução de proteínas com agente redutor.	19
Figura 6	- Migração de proteínas e íons do tampão em um sistema PAGE com desnaturação descontínua.	20
Figura 7	- Polimerização de monômeros de acrilamida e bisacrilamida.....	21
Figura 8	- Delineamento experimental do estudo.....	26
Figura 9	- Frações "proteicas" de leite cru, leite condensado integral e doce de leite tradicional comerciais (n = 3) em % m m ⁻¹	42
Figura 10	- Perfil proteico por SDS-PAGE das frações de PT e P(NCN)-AOAC das amostras de leite, leite condensado e doce de leite.....	48
Figura 11	- Perfil proteico por SDS-PAGE das frações P(NCN)-AD das amostras de leite, leite condensado e doce de leite.....	49
Figura 12	- Frações proteicas das amostras comerciais (3) de leite condensado integral em % m m ⁻¹	52
Figura 13	- Frações proteicas das amostras comerciais (3) de doce de leite tradicional em % m m ⁻¹	53
Figura 14	- Frações proteicas das amostras comerciais (3) de mistura láctea condensada em % m m ⁻¹	54
Figura 15	- Perfil proteico por SDS-PAGE das frações de PT e do precipitado da fração de P(NCN)-AOAC das amostras de leite condensado, doce de leite e mistura láctea condensada.	56
Figura 16	- Frações proteicas das amostras de leite UHT comercial, de leite condensado e doce de leite produzidos no laboratório em % m m ⁻¹	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Informações nutricionais de amostras comerciais.	38
Tabela 2	- Condições analíticas e teor de nitrogênio obtido para as diferentes frações nitrogenadas de leite cru, leite condensado e doce de leite.	40
Tabela 3	- Parâmetros de repetibilidade (r), reprodutibilidade (R) e CV% das frações nitrogenadas em leite cru, leite condensado e doce de leite (ISO 5725-2:1994).....	46
Tabela 4	- Informações nutricionais de amostras comerciais de leite condensado integral, doce de leite tradicional e mistura láctea condensada (valores expressos em g 100 g ⁻¹).	50
Tabela 5	- Parâmetros de composição físico-química das amostras de leite, leite condensado e doce de leite (valores expressos em % m m ⁻¹ , exceto sólidos solúveis em °Brix).	51
Tabela 6	- Parâmetros de composição físico-química das amostras de leite UHT comercial, doce de leite e leite condensado produzidos no laboratório (valores expressos em % m m ⁻¹ , exceto os sólidos solúveis em ° Brix).	57

LISTA DE SIGLAS

AD	<i>Aschaffenburg e Drewry</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APS	persulfato de amônio
BSA	albumina sérica bovina
CAS	caseínas
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CV%	coeficiente de variação
DP	desvio padrão
EST	extrato seco total
EUA	Estados Unidos da América
HMF	5-hidroximetilfurfural
IG	imunoglobulinas
MC	micelas de caseína
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NCN	nitrogênio não caseínico
NPN	nitrogênio não proteico
NT	nitrogênio total
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PP	proteose peptona
PV	proteína verdadeira
r	repetibilidade
R	reprodutibilidade
RISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RMF	resíduo mineral fixo
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
SDS	dodecil sulfato de sódio
Sp	proteínas do soro
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina
TRIS	trishidroximetilaminometano
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UHT	<i>ultra high temperature</i>
α -LA	alfa-lactoalbumina

β -LG

beta-lactoglobulina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO GERAL	23
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	METODOLOGIA.....	24
3.1	AMOSTRAS	24
3.2	REAGENTES.....	24
3.3	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	25
3.4	ANÁLISES.....	26
3.4.1	Proteínas	26
3.4.1.1	<i>Frações proteicas</i>	<i>27</i>
3.4.1.2	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio</i>	<i>31</i>
3.4.2	Composicional.....	32
3.4.2.1	<i>Extrato seco total</i>	<i>32</i>
3.4.2.2	<i>Sólidos solúveis</i>	<i>33</i>
3.4.2.3	<i>Resíduo mineral fixo</i>	<i>33</i>
3.4.2.4	<i>Gordura por Gerber.....</i>	<i>34</i>
3.4.2.5	<i>Gordura por Mojonnier.....</i>	<i>34</i>
3.5	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	36
4	RESULTADOS.....	38
4.1	OTIMIZAÇÃO ANALÍTICA POR <i>KJELDAHL</i>	38
4.2	FRAÇÕES NITROGENADAS E PERFIL PROTEICO.....	41
4.3	AVALIAÇÃO DE PRODUTOS CONCENTRADOS.....	50
4.4	PRODUÇÃO DE LÁCTEOS CONCENTRADOS	57
5	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIA.....	60

1 INTRODUÇÃO

Este trabalho se insere no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e investiga as frações proteicas presentes nos produtos lácteos concentrados mais popularizados no Brasil, o leite condensado e o doce de leite, bem como no leite cru de vaca. O estudo do fracionamento proteico das matrizes lácteas mencionadas é de grande relevância para a comunidade científica e industrial, a fim de garantir a qualidade nutricional e subsidiar o desenvolvimento de novas aplicações tecnológicas.

É sabido que o estudo da química dos alimentos busca compreender as características que identificam e demonstram as propriedades moleculares, assim como os processos para garantir a segurança das matrizes alimentares (Damodaran; Parkin; Fennema, 2010). Com o crescente desenvolvimento de produtos que se destacam pelo seu valor nutricional equilibrado, adequados às necessidades específicas de cada consumidor, inicia-se uma busca por estudos que exploram a inovação em vista dos avanços da ciência e da tecnologia de produtos alimentícios (Oriente *et al.*, 2023). Diante disso, é visto que os estudos seguem em ascendência e estão alinhados ao desenvolvimento de produtos lácteos inovadores (Yadav *et al.*, 2025).

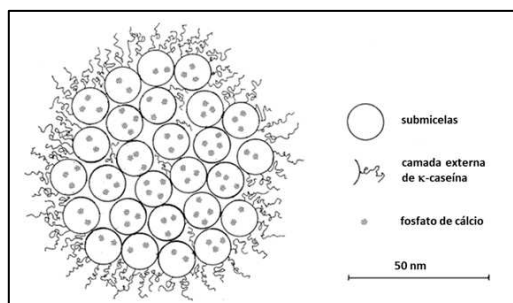
O leite de vaca é a matéria prima essencial para a fabricação de produtos lácteos concentrados, como o leite condensado e o doce de leite. A classificação do leite cru de vaca pela legislação brasileira é regida pela Instrução Normativa de nº 76 de 26 de novembro de 2018, que define o leite cru refrigerado como o produto da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, refrigerado e transportado para posto de refrigeração ou estabelecimento industrial adequado (Brasil, 2018a). O leite cru apresenta um perfil nutricional muito rico e de grande importância na alimentação humana, atuando como fonte de energia e suplementação no organismo. Em sua composição de macro e micronutrientes do leite de vaca cru encontramos, em média, cerca de 86,6% $m\ m^{-1}$ de água, 3,6% $m\ m^{-1}$ de proteínas, 4,1% $m\ m^{-1}$ de lipídios e, 5,0% $m\ m^{-1}$ de lactose (Damodaran; Parkin; Fennema, 2010).

Uma das macromoléculas mais importantes e mais bem exploradas no leite, pelo seu vasto número de funcionalidades, são as proteínas. As proteínas representam um dos

constituintes mais significativos do leite e exercem um papel fundamental na estabilidade do sistema coloidal (Nayik *et al.*, 2024). De acordo com Javed e colaboradores, as proteínas presentes no leite tem concentração média de 3,0% m v⁻¹ a 3,5% m v⁻¹ e, em condições específicas, como concentradas, ajudam na prevenção de doenças, como o câncer, a obesidade, a hipertensão e também doenças cardiovasculares (Javed *et al.*, 2022). As proteínas são macromoléculas singulares que são geradas a partir da interação de um grupo amino ($-NH_2$) de um aminoácido com um grupo carboxila ($-COOH$) de outro aminoácido, gerando assim ligações peptídicas características (Blanco, 2006).

No leite estão presentes dois grandes grupos de proteínas majoritárias, que são as caseínas, presentes em 80% e, as proteínas do soro, que constituem os 20% das proteínas totais do leite (Damodaran; Parkin; Fennema, 2010). As frações proteicas existentes no leite possuem natureza química diversificada e comportamentos físicos e químicos distintos, por isso é importante explorar suas especificidades (Walstra; Wouters; Geurts, 2006). As caseínas são estruturas encontradas no leite como micelas de caseína (MC) e, através da Figura 1, podemos visualizar um dos formatos encontrados na literatura científica atual (Silva *et al.*, 2019).

Figura 1 - Representação das micelas de caseína proposto por Walstra.



Fonte: Adaptado de (Silva *et al.*, 2019).

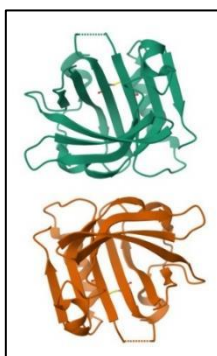
Encontram-se quatro tipos de caseínas: α_{s1} - caseína, α_{s2} - caseína, κ -caseína e, β -caseína, nas quais se organizam formando estruturas micelares estáveis, sendo insolúveis em pH médio de 4,6 (Wusigale; Liang; Luo, 2020). As micelas de caseína são estruturas supramoleculares fosforiladas, constituídas de fosfato de cálcio, que possuem em seu interior as frações de α_{s1} - caseína, α_{s2} - caseína e β -caseína e, na sua superfície frações de κ -caseína (Silva *et al.*, 2019). As MC possuem propriedades anfifílicas, pois possuem em seu interior características hidrofóbicas e, no seu exterior, partes hidrofílicas. É bem conhecido e estabelecido que existem uma proporcionalidade das frações caseínica entre

si, sendo α_{s1} - caseína, α_{s2} - caseína, β -caseína e, κ -caseína, 4:1:4:1, respectivamente (Bobe *et al.*, 1998).

O grupo das caseínas apresentam características mais termoestáveis se comparado as demais proteínas do leite, mas, são sensíveis a variações de pH, à presença de íons cálcio no meio, bem como alterações na concentração de moléculas no sistema coloidal (Padilla; Zambrano Arteaga, 2021). No viés tecnológico, as caseínas são as macromoléculas que contribuem diretamente para a viscosidade e a capacidade de retenção de água de matrizes alimentares (Lai; Tsopmo, 2025). Em produtos lácteos concentrados, como o doce de leite, leite condensado e similares, o processo de concentração e aquecimento térmico provocam alterações na organização das MC, favorecendo a aproximação entre elas, consequentemente à formação de agregados proteicos, impactando de forma direta as propriedades físico-químicas e estruturais do produto final (Stephani *et al.*, 2019).

O outro grupo de proteínas bastante explorado na química dos alimentos são as proteínas do soro. Dentre as mais conhecidas, podemos citar, a α -lactoalbumina, a β -lactoglobulina, albumina do soro bovino, lactoferrina e as imunoglobulinas. As proteínas do soro, diferentemente das caseínas, permanecem solúveis na faixa de pH do leite e não precipitam em pH próximo a 4,6 (Haraguchi; Abreu; Paula, 2006). Estruturalmente, as proteínas do soro apresentam estruturas mais simples se comparado com as MC, como a Figura 2, dada a seguir, referente a proteína globular β -lactoglobulina.

Figura 2 - Estrutura tridimensional cristalográfica da β -lactoglobulina bovina (isoforma A), obtida por difração de raios X (resolução 2,0 Å). Estrutura depositada no Protein Data Bank sob o código PDB: 1QG5.



Fonte: Adaptado de (Oliveira *et al.*, 2001; WWPDB Consortium, 2001).

Em processos de concentração e de aquecimento aplicados na produção de produtos lácteos concentrados, como o doce de leite e o leite condensado e afins, temos

modificações também nas proteínas presentes no soro (Carneiro *et al.*, 2021). Esse grupo de proteínas é caracterizado por ter elevada sensibilidade térmica devido principalmente à sua estrutura globular. A β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina, quando submetidas ao tratamento térmico sofrem desnaturação parcial ou total, ocasionando a exposição dos grupos com características hidrofóbicas e grupos sulfidril ($-SH$) que favorecem as reações de agregação e as interações com MC (Lee; Hong, 2003). A redução de água em produtos lácteos concentrados, como no doce de leite, leite condensado e afins, ocasiona a intensificação da proximidade molecular, causando a formação de agregados proteicos e complexos proteína-proteína, que impactam diretamente com o produto final, modificando os atributos tecnológicos como a viscosidade, estabilidade e textura (Carneiro *et al.*, 2021).

O leite condensado, produto amplamente utilizado na culinária mundial, foi desenvolvido no século XIX, inicialmente com estudos de *Nicolas Appert*, por volta do ano de 1820 com a finalidade de conservação do leite. A alternativa de concentração dos alimentos possibilitou o desenvolvimento de novo produtos. A escalabilidade industrial desse produto só se deu 26 após a sua descoberta, com os avanços nos estudos por *Gail Borden Jr.*, tendo um grande aumento na produção entre os anos de 1861 e 1865, período esse referente à Guerra de Sesseção dos Estados Unidos da América (EUA) (Maria *et al.*, 2024). O leite condensado teve grande aplicação em conflitos de guerra, pois era classificado como um alimento nutricional e energético para os soldados, tendo sua durabilidade e armazenamento estendidos, adequados ao momento (Pearson, 2016).

No Brasil, o leite condensado é classificado pela Instrução Normativa de nº 47, de 26 de outubro de 2018, do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como “o produto resultante da desidratação parcial do leite, leite concentrado ou leite reconstituído, com adição de açúcar, podendo ter seus teores de gordura e proteínas ajustados unicamente para o atendimento das características do produto”. De acordo com a legislação brasileira, o leite condensado deve apresentar o teor mínimo de 6,5% $m\ m^{-1}$ de proteína, teor mínimo de gordura de 8,0% $m\ m^{-1}$, teor máximo de umidade de 27,0% $m\ m^{-1}$, e, teor máximo de cinzas de 2,0% $m\ m^{-1}$ (Brasil, 2018b). Encontramos no mercado, diferentes tipos de leite condensado, principalmente com diferentes teores de proteína, esses provenientes de leite desnatado, semidesnatado e integral, tendo uma grande variabilidade na culinária (Brasil, 2018b).

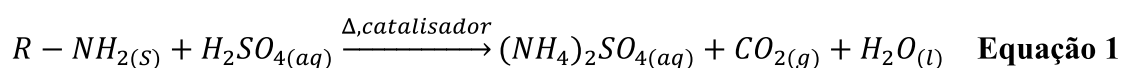
Nas gôndolas do comércio brasileiro, encontram-se produtos típicos e muito similares com o leite condensado, que são as misturas lácteas condensadas, uma subcategoria das misturas lácteas. São produtos que são submetidos ao processamento de concentração e apresentam consistência, viscosidade, e o uso bem similares ao leite condensado tradicional (Brasil, 2017). As misturas lácteas condensadas são produtos que contêm em sua constituição o leite ou derivados do leite, combinados com outros ingredientes. Podemos encontrar soro de leite, amidos, gorduras vegetais e estabilizantes. Do ponto de vista legal, esses produtos são inclusos no decreto de nº 9.013 de 2017 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RISPOA), além de atenderem às normas de rotulagem propostos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Diferentemente do leite condensado, as misturas lácteas condensadas não possuem Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) específico, resultando na grande variabilidade composicional de produtos, justificando a sua inclusão no presente estudo (Brasil, 2002, 2003, 2017, 2018b; Walstra; Wouters; Geurts, 2006).

O doce de leite é um produto lácteo amplamente consumido na América Latina, e sendo por isso, tem sido objeto de numerosos estudos científicos nos últimos anos (Gaze *et al.*, 2015). Na legislação brasileira, o doce de leite é regido pelo RTIQ e aprovado pela Portaria nº 354, de 4 de setembro de 1997, e é classificado como sendo “produto obtido pela concentração do leite ou leite reconstituído, com adição de sacarose ou outros açúcares permitidos, mediante aquecimento sob pressão atmosférica normal ou reduzida, até obtenção de consistência cremosa ou pastosa, apresentando cor e sabor característicos do produto final” (Brasil, 1997). As proteínas presentes no doce de leite possuem modificações estruturais muito severas, ocasionando novas interações, como proteína-proteína e, proteína-carboidrato que acarretam modificações nas propriedades físico-químicas do produto final (Martins; Jongen; Van Boekel, 2000). Os parâmetros de composição e identidade do doce de leite é regido pela RTIQ, estabelecido pela Portaria de nº 354, de 4 de setembro de 1997, exige que o produto, na sua forma pastosa, deve conter no mínimo 5% $m\ m^{-1}$ de proteína, no mínimo 6% $m\ m^{-1}$ de gordura, no máximo 30% $m\ m^{-1}$ de umidade e, no máximo 2% $m\ m^{-1}$ de cinzas (Brasil, 1997).

A quantificação do teor de proteínas em alimentos é de grande importância para quesito de qualidade. Tradicionalmente, a determinação de proteínas é realizada por métodos baseados na quantificação de nitrogênio total, ou seja, uma determinação

indireta, que é relacionada com a relação estequiométrica entre o nitrogênio e a proteína (Damodaran; Parkin; Fennema, 2010). A quantificação de proteínas da forma direta não é bem aceita na comunidade científica, pois as proteínas não são únicas e sim, um conjunto heterogêneo de moléculas organizados em diferentes estruturas e ainda com propriedades físico-químicas bem distintas (Fox *et al.*, 2015). Quando se trata de proteínas, não existe um grupo funcional ou um sinal analítico que seja classificado como universal no mundo das proteínas alimentares. Em contrapartida, temos o elemento químico nitrogênio presente e, relativamente constante em sua estrutura química que, possibilita a quantificação com elevada precisão e reprodução, devida a formação de íons amônio após a digestão (Damodaran; Parkin; Fennema, 2010; Skoog; West, 2014).

O método mais comumente utilizado para quantificação de proteínas através da determinação de nitrogênio total é o método *Kjeldahl*. Consiste num método oficial bem definido pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), onde sua aplicação prática faz a conversão total do nitrogênio orgânico presente na amostra para uma espécie química estável, que é o íon amônio. O método possui algumas etapas bem definidas, sendo que, na primeira etapa ocorre o processo da digestão ácida, na qual a matéria orgânica presente na amostra é completamente digerida, tendo a coloração modificada de marrom escuro para esverdeado límpido (AOAC, 2019a; Kjeldahl, 1883; International Organization For Standardization, 2014). A digestão ácida pode ser representada de forma genérica e simplificada, conforme a Equação 1 (Skoog; West, 2014).



Onde:

R – NH₂: representa o nitrogênio orgânico que está contido nas estruturas proteicas;

H₂SO₄: representa o ácido sulfúrico (ácido forte) que atua como agente desidratante e meio reacional, que promove a decomposição da matéria orgânica;

catalisador: representa as moléculas que aceleram a reação química;

Δ: representa a elevação de temperatura no meio reacional;

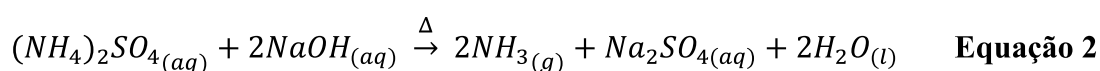
(NH₄)₂SO₄: representa a molécula mais estável formada pelo nitrogênio que foi convertido;

CO₂ e H₂O: representam as moléculas formados na oxidação;

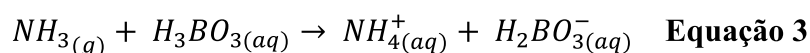
A digestão ácida na metodologia *Kjeldahl* tem o papel de converter quase todo o nitrogênio orgânico presente nas amostras em íons amônio (NH_4^+), provenientes de proteínas, aminoácidos livres, peptídeos, e, nitrogênios de outros compostos não ligados a proteínas, como amidas, aminas, ureia, dentre outros. O carbono presente no meio, bem como o hidrogênio, sofre o processo de oxidação à dióxido de carbono e água, respectivamente e, o nitrogênio do meio convertido para uma forma química estável. A digestão ocorre em aquecimento intenso e contínuo para completa mineralização (Lutz, 2008).

Para que todo o processo de digestão ácida ocorra de forma eficiente, é indispensável o uso de catalisadores, como o sulfato de potássio (K_2SO_4) e o sulfato de cobre (CuSO_4), nos quais têm a função de elevar o ponto de ebulição do ácido sulfúrico, e ser catalisador na oxidação do carbono e o hidrogênio, respectivamente. Ao final do processo, encontram-se no meio reacional, sulfato de amônio, ácido sulfúrico residual e sais inorgânicos. Vale ressaltar que nitrogênio provenientes de espécies nítricas e nitrosas, NO_3^- e NO_2^- , respectivamente, não são reduzidas a íon amônio, NH_4^+ (Silva, 2002).

Na segunda etapa do método *Kjeldahl*, a amostra digerida sofre o processo de alcalinização a partir do uso de hidróxido de sódio, os íons amônio, $-\text{NH}_4^+$, são transformados em amônia gasosa, NH_3 . A Equação 2 representa o processo ocorrido nessa segunda etapa (AOAC, 2019a; Nelson; Sommers, 1982).

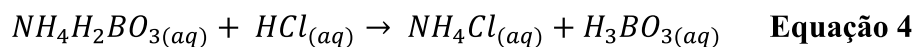


Complementando a segunda etapa, a amônia é arrastada até a solução receptora ácida (contendo ácido bórico e indicador misto de azul de metileno e vermelho de metila), formando um sistema tampão de coloração esverdeada, na presença de nitrogênio na amostra analisada. A Equação 3 representa essa etapa do processo (AOAC, 2019a; Nelson; Sommers, 1982).



Na terceira etapa do processo, a mistura formada na segunda etapa é titulada contra uma solução padrão de ácido forte, usualmente ácido clorídrico padronizado. Quimicamente, a reação é do tipo ácido-base, onde o ponto final é verificado pela coloração do indicador, variando a cor de esverdeado para rosa claro, entre a faixa de pH

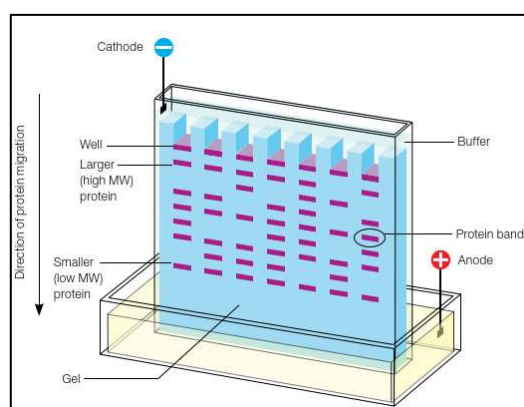
4,6 a 5,0. Ao final da titulação, o volume gasto de titulante é proporcional a quantidade de nitrogênio presente na amostra. A Equação 4, dada a seguir representa a neutralização química do meio (AOAC, 2019a; Nelson; Sommers, 1982).



A quantificação de proteínas é determinada pelo uso de fatores de conversão de nitrogênio para proteína, no qual se baseia na proporção média presente na proteína avaliada. Na literatura científica, o fator de conversão de leite e seus derivados mais frequentemente utilizado é o de 6,38, mas, encontra-se fatores diferenciados para cada matriz, como por exemplo de misturas proteicas, no qual o fator de conversão é de 6,25 (Lutz, 2008).

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) consiste numa separação eletroforética de proteínas em função da massa molecular aparente, como exposto na Figura 3.

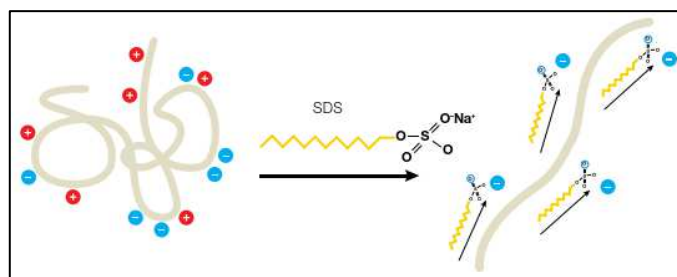
Figura 3 - Esquema de separação eletroforética de proteínas em um gel de poliacrilamida.



Fonte: Adaptado de (Bio-Rad Laboratories, 2012).

Inicialmente, as amostras proteicas são submetidas a um preparo de amostra, com o uso de SDS, agente redutor, em aquecimento, para que as macromoléculas se complexem com o detergente, aumentando a carga negativa superficial, e se desnaturem a fim de se tornar lineares, tornando a razão carga/massa constante para cada tipo de proteína. A Figura 4, mostra como o SDS atua na estrutura das proteínas (Bio-Rad Laboratories, 2012).

Figura 4 - Efeito do SDS na conformação e carga de uma proteína.



Fonte: Adaptado de (Bio-Rad Laboratories, 2012).

A estrutura das proteínas é modificada e, as ligações dissulfeto ($-S-S-$), são reduzidas à grupos sulfidríla, ($-SH$), conforme modelo proposto na Equação 5 e na Figura 5 dada a seguir (Bio-Rad Laboratories, 2012).

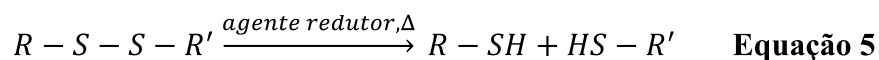
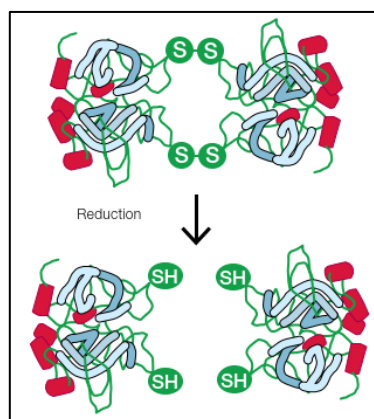


Figura 5 - Redução de proteínas com agente redutor.



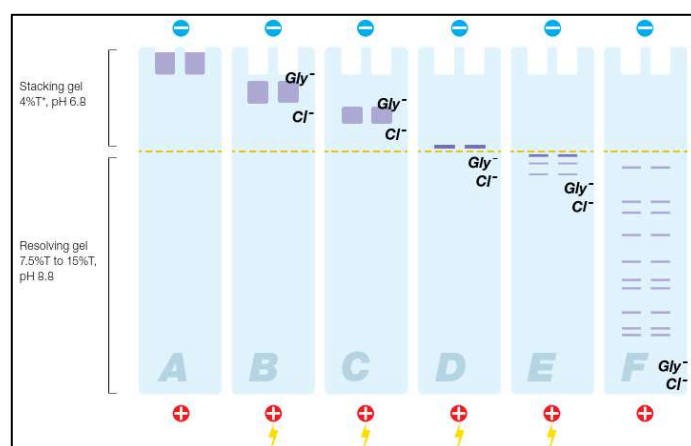
Fonte: Adaptado de (Bio-Rad Laboratories, 2012).

As proteínas desnaturadas migram através do gel de poliacrilamida com tamanhos de poros controlados, sob ação de um campo elétrico e sofrem a separação pelo efeito de peneiramento molecular da matriz. O sistema proposto por *Laemmli* em 1970 padronizou o processo e aplicou o sistema descontínuo. Na descrição dos componentes desse sistema, podemos mencionar: O gel de empilhamento (*stacking gel*), no qual possui alta porosidade, pH mais baixo ($\approx 6,8$). A função desse gel é “empilhar” e concentrar as proteínas antes do processo de separação; O gel de separação (*Resolving* ou *Separating gel*) possui pH mais alto ($\approx 8,8$), com porosidade menor e é o gel no qual ocorre a separação proteica pelas massas moleculares (Laemmli, 1970; Kurien *et al.*, 2015).

O tampão de corrida utilizada na técnica (*running buffer*) é constituído de

tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) juntamente com a glicina, e o sistema em pH constante de 8,3. O efeito *stacking* ocorre desde o carregamento das proteínas nos poços, onde estão revestidas por cargas negativas, devido à presença de SDS. No tampão de corrida, os íons cloreto (Cl^-), presentes no gel de empilhamento, em conjunto com os íons glicinato ($H_2N - CH_2 - COO^-$), presente no tampão de corrida, se movem em velocidades distintas no meio, rapidamente e lentamente, respectivamente, formando um efeito sanduiche. As proteínas ficam “presas” entre os dois íons, devido à variação de pH e porosidade e, com isso, se concentram numa banda fina (*stacking*). Já no gel de separação, ocorre a ionização completa do glicinato, no qual sua velocidade de migração é maior do que as proteínas, ocasionando então a separação das proteínas em função somente da sua massa molecular (Laemmli, 1970; Kurien *et al.*, 2015). Na Figura 5, podemos observar a migração das proteínas.

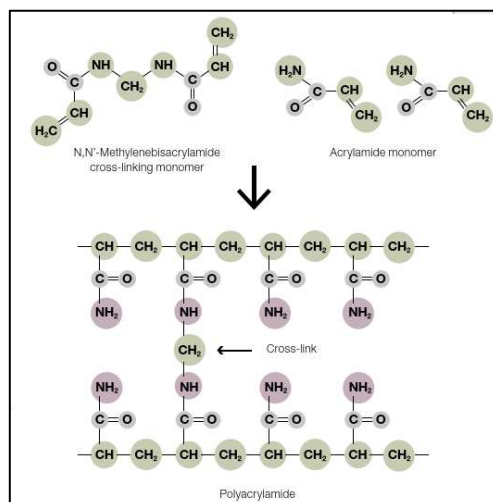
Figura 6 - Migração de proteínas e íons do tampão em um sistema PAGE com desnaturação descontínua.



Fonte: Adaptado de (Bio-Rad Laboratories, 2012).

As soluções envolvidas no método de SDS-PAGE possuem suas funções específicas. O SDS, confere as cargas negativas para todas as moléculas proteicas do meio. Quimicamente, na solução de *N, N'*-metilenobisacrilamida e acrilamida, a acrilamida, quando polimerizada, origina cadeias lineares, e a *N, N'*-metilenobisacrilamida, têm a função de atuar como agente de reticulação (*crosslinking*), promovendo as ligações cruzadas entre as cadeias (Laemmli, 1970; Kurien *et al.*, 2015).

Figura 7 - Polimerização de monômeros de acrilamida e bisacrilamida.



Fonte: Adaptado de (Bio-Rad Laboratories, 2012).

O processo confere ao gel formado sua estrutura tridimensional, na qual podemos controlar o tamanho dos poros conforme a concentração dos reagentes, para que possamos aplicar em diferentes sistemas proteicos (Laemmli, 1970; Kurien *et al.*, 2015). A polimerização de fato se inicia quando temos a presença do persulfato de amônio, $(NH_4)_2S_2O_8$, e do N,N,N',N' -tetrametiletenodiamina (TEMED), $(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$, onde o persulfato libera radicais livres para dar início à polimerização e, o TEMED têm a função de catalisar e acelerar a decomposição do persulfato, em temperatura ambiente controlada. A gelificação do gel está intimamente relacionada com a proporção de cada um dos reagentes em questão, determinando também o tamanho dos poros produzidos, conduzindo assim a separação adequada das proteínas (Bio-Rad Laboratories, 2012).

Considerando que as proteínas lácteas quando expostas a processos como a concentração e aquecimento possuem suas estruturas muito complexas, e, portanto, aplicações de técnicas e métodos analíticos clássicos para tais produtos demandam alterações para que a caracterização e quantificação sejam realizadas de forma adequadas. O método Kjeldahl apresenta-se como uma importante ferramenta para a quantificação de compostos nitrogenados e, previamente à sua aplicação, pode ser realizado o preparo da amostra, visando à sua abertura e ao consequente fracionamento de proteínas. A técnica da SDS-PAGE complementa de forma satisfatória à separação e a visualização das proteínas. Portanto, a aplicação conjunta (*Kjeldahl* + SDS-PAGE) torna-se uma estratégia eficaz para a caracterização e quantificação das frações proteicas de produtos lácteos concentrados, como o doce de leite, leite condensado e mistura láctea condensada,

contribuindo para possíveis aplicações tecnológicas futuras.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta dissertação é adaptar, validar e aplicar metodologias analíticas baseadas em Kjeldahl e SDS-PAGE para quantificação e caracterização das frações proteicas presentes em produtos lácteos concentrados (doce de leite, leite condensado e mistura láctea condensada), visando compreender as alterações no perfil proteico decorrentes do processamento térmico e da concentração.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar e adaptar as condições analíticas das metodologias oficiais AOAC e Aschaffenburg-Drewry para quantificação de frações nitrogenadas em doce de leite tradicional e leite condensado integral;
- b) Quantificar as frações nitrogenadas (NT, NCN, NPN) e caracterizar o perfil proteico por SDS-PAGE de amostras comerciais de leite cru, leite condensado integral e doce de leite tradicional;
- c) Comparar os resultados das frações NCN e NT obtidos pelo método Kjeldahl com os perfis proteicos observados por SDS-PAGE nas amostras de leite condensado integral e doce de leite tradicional;
- d) Ampliar a avaliação para múltiplas marcas comerciais de leite condensado integral (n=3), doce de leite tradicional (n=3) e misturas lácteas condensadas (n=3), caracterizando suas frações proteicas e composição físico-química;
- e) Produzir, em escala laboratorial, amostras de doce de leite e leite condensado a partir de leite UHT, avaliando sua composição físico-química e frações proteicas;
- f) Comparar os perfis proteicos das amostras laboratoriais com os produtos comerciais, visando compreender o comportamento das frações proteicas sob condições controladas de processamento.

3 METODOLOGIA

Nesta sessão, iremos descrever todas as amostras, metodologias e análises utilizados durante a execução desse trabalho.

3.1 AMOSTRAS

Foram adquiridos do comércio de Juiz de Fora/MG uma marca de leite UHT, três diferentes marcas de leite condensado integral, três marcas de misturas lácteas condensadas e três marcas de doce de leite tradicional. A amostra de leite cru foi obtida na área rural da cidade.

Além das amostras comerciais, foram produzidas duas amostras em escala laboratorial, uma de doce de leite tradicional e uma amostra de leite condensado integral, ambas partindo de leite UHT.

3.2 REAGENTES

Durante toda a execução do trabalho, foram utilizados os seguintes reagentes químicos:

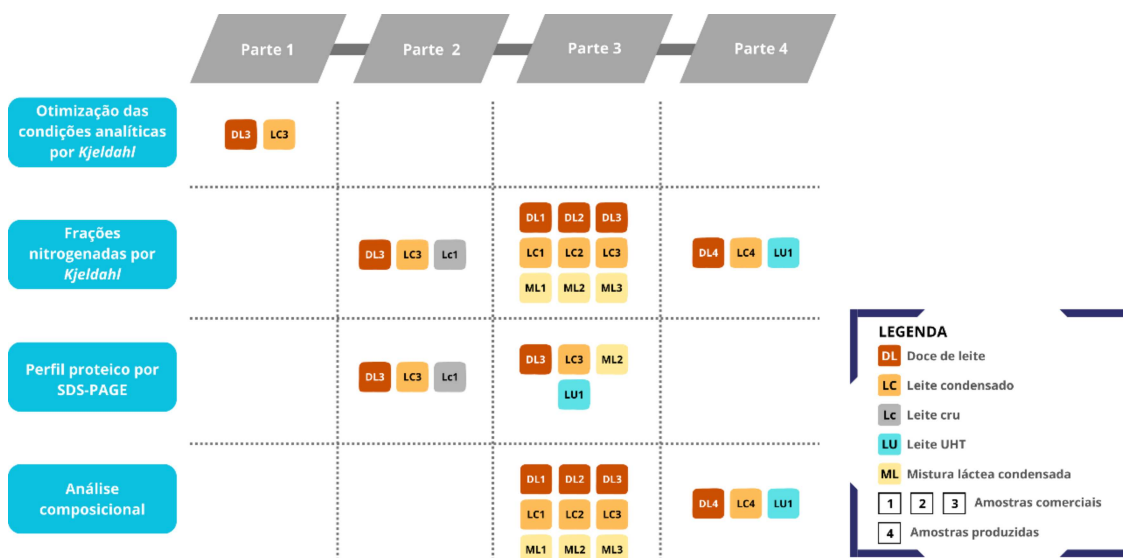
- 2-Mercaptoetanol (Neon, CAS 60-24-2);
- Acetato de sódio anidro PA (Nox, CAS 127-09-3);
- Ácido acético 99% v v⁻¹ (Didática SP, CAS 64-19-7);
- Ácido bórico 4% m v⁻¹ (Êxodo, CAS 10043-35-3);
- Ácido clorídrico P.A. (Synth, CAS 7647-01-0);
- Ácido sulfúrico P.A. (Synth, CAS 7664-93-9);
- Ácido sulfúrico para análise de leite (Synth, 7664-93-9);
- Ácido tricloroacético P.A. (Êxodo, CAS 76-03-9);
- Acrilamida (Neon, CAS 79-06-1);
- Álcool isoamílico (Synth, CAS 123-51-3);
- Álcool etílico P.A. (Neon, CAS 64-17-5);
- Azul de bromofenol (Synth, CAS 115-39-9);
- Azul de metileno (Synth, CAS 61-73-4);
- Bisacrilamida (Sigma, CAS 110-26-9);
- Éter de petróleo P.A. – ACS (Dinâmica, CAS 8032-32-4);
- Éter etílico P.A. (Synth, CAS 60-29-7);
- Glicerol (Sigma, CAS 56-81-5);

- Glicina (Sigma, CAS 56-40-6);
- Hidróxido de sódio 50% m v⁻¹ (Êxodo, CAS 1310-73-2);
- Hidróxido de amônio P.A. (Êxodo, CAS 1336-21-6);
- Metanol P.A. (Êxodo, CAS 67-56-1);
- Padrão de proteínas recombinantes (Invitrogen, sem CAS);
- Persulfato de amônio (Neon, CAS 7727-54-0);
- SDS (Biorad, CAS 151-21-3);
- Solução de Coomassie;
- Solução de descoloração;
- Sulfato de cobre II pentahidratado (Êxodo, CAS 7758-98-7);
- Sulfato de potássio anidro (Êxodo, CAS 7778-80-5);
- Tampão de corrida;
- TEMED (Biorad, CAS 110-18-9);
- TRIS-HCl 2M pH 6,8(Biorad, CAS 1185-53-1);
- Vermelho de Congo (Êxodo, CAS 573-58-0);
- Vermelho de metila (Êxodo, CAS 493-52-7).

3.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Na Figura 8, apresenta-se o delineamento aplicado durante a execução do trabalho, organizado em quatro partes para maior clareza. Na **parte 1**, realizou-se um estudo exploratório com o intuito de avaliar e adaptar as condições analíticas para a quantificação no método *Kjeldahl* de amostras de leite condensado e doce de leite. Na **parte 2**, após a validação das condições de análise, de concentração da solução inicial da amostra, volume adicionado no tubo *Kjeldahl*, foi aplicado a metodologia das frações nitrogenadas para as amostras de doce de leite e leite condensado e os resultados foram utilizados na comparação do perfil proteico por SDS-PAGE. Na **parte 3**, foi avaliado um número maior de amostras comerciais de doce de leite e leite condensado (três marcas de cada produto) e, fez-se a inclusão da análise de misturas lácteas condensadas (três marcas distintas) e, comparou-se os perfis eletroforéticos da fração de NCN, além da análise composicional das amostras. Na **parte 4**, realizou-se a produção, em pequena escala, de doce de leite e leite condensado e após, foi realizada a análise composicional dos produtos, além das frações proteicas dessas amostras.

Figura 8 - Delineamento experimental do estudo.



Fonte: Próprio autor (2026).

3.4 ANÁLISES

A fim de compreender uma das principais macromoléculas pertencentes aos produtos lácteos concentrados, é que realizamos as principais análises proteicas e composicionais. A ordem e divisão das análises nesse documento foi pensada na ordem cronológica que foram desenvolvidas.

3.4.1 Proteínas

A determinação da proteína dos produtos lácteos foi realizada pelo método *Kjeldahl*, conforme descrito por Wolfshoon-Pombo (1980). Para a análise, utilizou-se um bloco digestor, marca Tecnal, modelo TE041/25, acoplado a um destilador de nitrogênio da marca Tecnal, modelo TE-0364. Foram pesados entre 1 g a 5 g do produto lácteo em tubos micro-*Kjeldahl*, aos quais foram adicionados 1,6 g do catalisador, constituído por uma mistura de sulfato de cobre e sulfato de potássio, além de 4,0 mL de ácido sulfúrico P.A. (WOLFSCHOON-POMBO, 1980).

O conjunto foi submetido ao processo de digestão em rampa de aquecimento

gradual (patamar 1: 100°C; patamar 2: 150°C; patamar 3: 200°C; patamar 4: 400°C), atingindo 400 °C, por um período aproximado de 3,5 horas. Após a digestão, procedeu-se à destilação da amostra na presença de solução de hidróxido de sódio, NaOH, a 50% m v⁻¹. Em seguida, realizou-se a titulação de retorno com solução de ácido clorídrico, HCl, com concentração a depender da amostra (≈ 0,01 mol L⁻¹ ou 0,003 mol L⁻¹), previamente padronizada, para a determinação do teor de nitrogênio (Wolfschoon-Pombo, 1980). Para a quantificação do teor de nitrogênio, m v⁻¹, podemos aplicar a Equação 6.

$$\% N (m v^{-1}) = \frac{(V_a - V_b) \times F \times 0,014 \times 100}{m} \quad \text{Equação 6}$$

Onde, V_a é o volume (em mL) de HCl gastos na titulação da amostra, V_b o volume (em mL) de HCl gastos na titulação do branco, F é fator de correção da concentração de HCl utilizado, m é a massa da alíquota e, 0,014 é fator de conversão que considera o equivalente do nitrogênio, como representado nas relações dada a seguir (Di Marzo; Pranata; Barbano, 2021).

$$\begin{aligned} 1 \text{ Eq. HCl} & \text{ --- } 1 \text{ Eq. de nitrogênio} \\ 1 \text{ mol L}^{-1} (1 \text{ Eq. } 1000 \text{ mL}^{-1}) & \text{ --- } 14,01 \text{ g nitrogênio} \\ 1 \text{ mol L}^{-1} (1 \text{ mL}) & \text{ --- } 0,014 \text{ g nitrogênio} \end{aligned}$$

Existem na literatura diferentes fatores de conversão e estes estão intimamente relacionados com o teor de nitrogênio presente nas estruturas proteicas. Em produtos lácteos no geral, temos que, em média, 15,67% da sua composição é nitrogênio, logo, pode-se calcular o fator de conversão utilizando a relação dada a seguir (Di Marzo; Pranata; Barbano, 2021).

$$\begin{aligned} 15,67 \text{ g de nitrogênio} & \text{ --- } 100 \text{ g de proteínas} \\ 1 \text{ g de nitrogênio} & \text{ --- } X \text{ g de proteínas} \\ X & = 6,38 \text{ g de proteínas} \end{aligned}$$

3.4.1.1 Frações proteicas

A fração proteica mais avaliada nos alimentos em geral é a fração nitrogenada total (NT). No caso das amostras concentradas, como o leite condensado, mistura láctea condensada e, doce de leite, se faz necessário o processo de diluição em água, sendo essa etapa crucial para garantir a homogeneidade e a reprodutibilidade dos resultados analíticos. Para

amostra de leite cru, adota-se a diluição inicial de 5% m m⁻¹, já estabelecida por Wolfschoon-Pombo (1980), na qual essa proporção visa adequar o teor de sólidos compatível com a faixa ideal de análise (AOAC, 2019a; International Organization For Standardization, 2014; BRASIL, 2006).

Na primeira parte do trabalho, para a avaliação do NT das amostras de leite condensado integral e de doce de leite tradicional, foram preparadas diferentes concentrações, 5%, 10% e 20% m m⁻¹, para a determinação da melhor solução tendo em vista o desvio padrão e solubilidade das amostras. Dessa maneira, foram estabelecidas as soluções de concentração 5% m m⁻¹ e 10% m m⁻¹, para leite condensado integral e doce de leite tradicional, respectivamente. Nas demais partes, foram seguidas as mesmas concentrações para as amostras de doce de leite tradicional e leite condensado integral e, para o leite cru, seguimos a norma descrita na AOAC de n° 991.20 (AOAC, 2019a). Para as amostras de mistura láctea condensada, partiu-se de soluções com concentração de 5% m m⁻¹. Ressalta-se a todas amostram foram avaliadas na faixa do semi micro *Kjeldahl*, que compreende de 0,1 mg a 2,0 mg de nitrogênio presente no tubo (Wolfschoon-Pombo, 1980).

Na avaliação da fração nitrogenada não caseínica, NCN, utilizamos duas metodologias distintas. A primeira foi desenvolvida por *Aschaffenburg e Drewry* (AD) em 1959 e tem como base científica a precipitação direta das proteínas do leite cru de vaca pelo uso de uma solução saturada de sulfato de sódio, Na_2SO_4 , na concentração de 40% m v⁻¹, a fim de aumentar a interação eletrólito-água (Aschaffenburg; Drewry, 1959). A alta concentração de íons presentes no meio reacional ocasiona uma diminuição da interação proteína-água, favorecendo consequentemente a agregação proteica, uma vez que as proteínas se tornam solúveis somente quando hidratadas (Kowacz, 2012; Buxbaum, 2015).

Nitrogênio não caseínico (NCN) – Método Aschaffenburg e Drewry

Leite cru: *in natura*.

Produtos concentrados (leite condensado, doce de leite, mistura láctea): solução 35% m m⁻¹.

Preparo de amostra: adicionou-se 40 mL de amostra e em 40 mL da solução de sulfato de sódio a 40% m v⁻¹ e, em seguida, adicionou-se solução de sulfato de sódio a

20% m v⁻¹ a fim de completar o volume final da mistura para 100 mL (Aschaffenburg; Drewry, 1959).

Separação: filtradas no filtro qualitativo de n°4, marca *Whatman*, de retenção nominal de partículas de 20 μm a 25 μm , e o sobrenadante avaliado na análise *Kjeldahl* (Aschaffenburg; Drewry, 1959).

O segundo método aplicado para avaliação do NCN de leite foi o descrito pela AOAC 998.05, que consiste na precipitação das caseínas por ajuste de pH, utilizando a mistura de ácido acético 10% v v⁻¹ e solução de acetato de sódio 1M, sob agitação constante, a fim de alcançar o pH final de 4,6, esse medido com o pHmetro de bancada, marca Gehaka, modelo PG2000. O pH 4,6 corresponde ao ponto isoelétrico médio das caseínas, ponto no qual as cargas superficiais se anulam, diminuindo conseqüentemente as forças de repulsão entre as moléculas e, aumentando a agregação e a precipitação das caseínas.

Nitrogênio não caseínico (NCN) – Método AOAC 998.05

Leite cru: *in natura*.

Produtos concentrados (leite condensado, doce de leite, mistura láctea): solução 35% m m⁻¹.

Preparo de amostra: adicionou-se 40 mL da amostra em 40 mL de água em um béquer de 250 mL, seguido do ajuste de pH (pH 4,6), para um volume final de 100 mL (AOAC, 2012^a).

Separação: filtradas em filtro qualitativo de n°40, marca *Whatman*, de retenção nominal de partículas de 8 μm e o sobrenadante avaliado na análise *Kjeldahl* (AOAC, 2012^a).

Os métodos para determinação de NCN permitem a quantificação das proteínas do soro na presença da fração nitrogenada não proteica (NPN). Mas, vimos diferenças metodológicas bastante relevantes. O método de AD, que utiliza a precipitação com o uso do sulfato de sódio, promove a separação das albuminas totais, onde podemos encontrar as frações de α -lactoalbumina (α – LA), β -lactoglobulina, (β – LG), e a albumina sérica bovina, (BSA), além da fração de NPN (Aschaffenburg; Drewry, 1959). Já o método descrito pela AOAC, 998.05, quantifica a totalidade das proteínas do soro presentes,

incluindo ainda as imunoglobulinas, (Ig), e as frações de proteose-peptona, (PP), além do NPN (AOAC, 2012a).

A fração que cada vez mais sendo explorada pela indústria de alimentos é a fração nitrogenada não proteica (NPN), proveniente de estruturas contidas no leite que apresentam nitrogênio em sua composição, porém não são consideradas proteínas, como a ureia, enzimas, aminoácidos, peptídeos e a creatina (González; Dürr; Fontaneli, 2001). Para que possamos fazer a análise dessa fração faz-se necessário a completa precipitação das proteínas presentes inicialmente.

Nitrogênio não proteico (NPN) – Método AOAC 991.21

Leite cru: *in natura*.

Produtos concentrados (leite condensado, doce de leite, mistura láctea): solução 35% m m⁻¹.

Preparo de amostra: utiliza-se cerca de 40 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 15% m v⁻¹ em 10 mL de amostra, a fim de ajustar a concentração final de TCA na mistura para 12% m v⁻¹, sendo essa concentração o ponto ótimo para a precipitação eficiente de proteínas e, conseqüentemente a separação adequada da fração de NPN (AOAC, 2012^b).

Separação: filtradas no filtro qualitativo de n°1, marca *Whatman*, de retenção nominal de partículas de 11 μm e o sobrenadante avaliado na análise *Kjeldahl* (AOAC, 2012^b).

A partir das frações nitrogenadas descritas anteriormente, NT, NCN e NPN, podemos encontrar de forma indireta outros tipos de fracionamento proteico que auxiliam no entendimento da matriz alimentar (Kielczewska *et al.*, 2021). Nas equações dadas a seguir, pode-se visualizar as relações matemáticas.

$$CAS = (NT - NCN) \times 6,38 \quad \text{Equação 7}$$

$$SP = (NCN - NPN) \times 6,38 \quad \text{Equação 8}$$

$$PV = (NT - NPN) \times 6,38 \quad \text{Equação 9}$$

Onde:

CAS: Representa a fração proteica das caseínas;

SP: Representa a fração das proteínas do soro;

PV: Representa a fração proteica verdadeira.

3.4.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

O perfil proteico dos produtos lácteos avaliados nesse trabalho - leite UHT, leite cru, leite condensado, doce de leite e mistura láctea condensada - foi obtido por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). De acordo com a literatura científica, em produtos lácteos em geral, as principais bandas observadas e que podem auxiliar na compreensão das matrizes alimentares, correspondem a de massas moleculares de aproximadamente 66 kDa (BSA), entre 23 kDa a 25 kDa (α e β caseínas), 19 kDa (κ -caseína), 18,4 kDa (β -LG) e, entre 12 kDa a 14 kDa (α -LA) (Chen; Chen; Hsieh, 2015).

Para a corrida eletroforética, o gel de separação foi preparado com concentração final de 15% m v⁻¹ de acrilamida/bisacrilamida, utilizando solução de acrilamida a 30% m v⁻¹, bis-acrilamida a 0,8% m v⁻¹, tampão TRIS-HCl de pH igual a 8,8, SDS a 10% m v⁻¹, água destilada, persulfato de amônio (APS) a 10% m v⁻¹ e *N, N, N', N'*-tetrametiletilenodiamina (TEMED). O gel de empilhamento foi preparado com concentração final de 4% m v⁻¹, contendo solução de acrilamida a 30% m v⁻¹, bis-acrilamida a 0,8% m v⁻¹, tampão TRIS-HCl de pH igual a 6,8, água destilada, APS a 10% m v⁻¹ e TEMED. O tampão de corrida 1× utilizado foi constituído por tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), glicina e SDS, com pH final ajustado para 8,3, conforme (He, 2011).

As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra 4x na proporção de 3:1 (amostra:tampão). O tampão de amostra foi composto por Tris-HCl com pH igual a 6,8, água, glicerol, SDS a 10% m v⁻¹, 2-mercaptoetanol e azul de bromofenol. Após a solubilização das amostras, as misturas foram submetidas à agitação em vórtex, aquecidas a 95 °C \pm 2 °C por 5 minutos e, em seguida, centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos com o objetivo de desnaturar as proteínas presentes no meio (Bio-Rad Laboratories, 2012). Como marcador de massa molecular, foi empregado o padrão de proteínas recombinantes *Novex Sharp*, da marca *Thermo Scientific*. Aproximadamente 10 μ L de cada amostra e dos padrões foram aplicados nos respectivos poços do gel (Hartl; Bister, 2013).

A corrida eletroforética teve duração de 1,5 horas, sob aplicação de potência constante de 100 mW. Em seguida, os géis foram submetidos à coloração em solução composta de azul de Coomassie, metanol P.A., água e ácido acético P.A., por um período de 2 horas. Após a coloração, realizou-se a etapa de descoloração utilizando a mesma solução, porém sem o corante, até a completa remoção do fundo azulado do gel, permanecendo coradas apenas as frações proteicas. Por fim, os géis foram escaneados para posterior análise (Goldring, 2018).

3.4.2 Composicional

As amostras foram avaliadas composicionalmente por meio de metodologias oficiais, explorando as análises de extrato seco total, sólidos solúveis (°Brix), resíduo mineral fixo (cinzas) e gordura. A análise de proteínas, embora integrante da composição, encontra-se descrita na seção 3.4.1 deste documento.

3.4.2.1 Extrato seco total

O teor de extrato seco total (EST) das amostras foi determinado pelo método de secagem em estufa, conforme metodologia descrita pela ISO 6731/IDF 21. Para essa análise, aproximadamente 5 g de amostra foram pesados em cápsulas de alumínio previamente secas e taradas, sendo então submetido o conjunto à secagem em estufa, (marca 7Lab, modelo SSAi), mantida a $102 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, até a obtenção de massa constante, definida como uma variação de massa inferior ou igual a 5 mg entre pesagens consecutivas. Após o processo de secagem, o teor de EST foi calculado de acordo com a Equação 10, apresentada a seguir (International Organization For Standardization; International Dairy Federation, 2010).

$$EST \% (m m^{-1}) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

m_0 : Representa a massa da cápsula vazia (g);

m_1 : Representa a massa da cápsula + massa da amostra antes da secagem (g);

m_2 : Representa a massa da cápsula + resíduo seco após a secagem (g);

3.4.2.2 *Sólidos solúveis*

A determinação dos sólidos solúveis (°Brix) foi realizada pelo método refratométrico, baseado na medida do índice de refração da amostra, utilizando-se um refratômetro portátil, marca Hanna, referência HI96801. Os resultados foram expressos em graus Brix (°Brix), unidade que corresponde aproximadamente à concentração de sacarose em solução, sendo que 1 °Brix equivale a cerca de 1 g de sacarose em 100 g de solução. O método adotado baseia-se nos procedimentos oficiais descritos pela AOAC 932.12 de 2019, amplamente empregado para a determinação de sólidos solúveis por refratometria (AOAC, 2019b).

Previamente às análises, o equipamento foi devidamente calibrado por meio da limpeza do prisma e da aplicação de água destilada, ajustando-se a leitura para 0,0 °Brix, conforme recomendado pela AOAC. Após a calibração, uma pequena alíquota da amostra, previamente homogeneizada, foi depositada sobre o prisma do refratômetro, assegurando-se a ausência de bolhas de ar e de partículas sólidas que pudessem interferir na leitura. A leitura foi então realizada diretamente na escala de °Brix do equipamento. Em produtos lácteos concentrados o valor encontrado na escala brix representa o teor de sólidos solúveis aparente, que na literatura científica é associado a concentração de açúcares (AOAC, 2019b).

3.4.2.3 *Resíduo mineral fixo*

A determinação do teor de resíduo mineral fixo (RMF), também denominado de cinzas, das amostras foi realizada por meio do processo de incineração em mufla, conforme descrito na metodologia ISO 1740 | IDF 25. Para essa análise, aproximadamente 5 g de amostra foram pesadas em cadinhos de porcelana previamente secos e tarados, os quais foram posteriormente submetidos à incineração em mufla (marca Quimis®), mantida a 550 °C, até a completa combustão da matéria orgânica e obtenção de massa constante, definida como uma variação de massa inferior ou igual a 5 mg entre pesagens consecutivas (International Organization For Standardization; International Dairy Federation, 2008). Após o processo de incineração, o teor de cinzas foi calculado com base na Equação 11.

$$\% \text{ cinzas } (m \ m^{-1}) = \frac{m_f - m_c}{m_a} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

Onde:

m_f : Representa a massa final do conjunto (amostra + cadinho) após a incineração (g);

m_c : Representa a massa do cadinho vazio (g);

m_a : Representa a massa inicial da amostra (g).

3.4.2.4 Gordura por Gerber

A determinação do teor de gordura para leites, cru e UHT, foi realizada pelo método de *Gerber*, um método volumétrico amplamente empregado na análise de produtos lácteos, conforme descrito na metodologia da AOAC 2000.18 de 2019. Inicialmente, foram adicionados 10,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, para análise de leite, com densidade aproximada de 1,820 g mL⁻¹. Em seguida, foram cuidadosamente adicionados 11,0 mL da amostra previamente homogeneizada, evitando-se o contato direto da amostra contra as paredes do butirômetro. Posteriormente, adicionou-se 1,0 mL de álcool isoamílico (AOAC, 2019c).

Os butirômetros foram então fechados com rolhas apropriadas e homogeneizados por inversão manual até completa dissolução do conteúdo. Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação em centrífuga específica para o método *Gerber*, a aproximadamente 1.200 rpm por 5 minutos, promovendo a separação das fases (AOAC, 2019c).

Após a centrifugação, os butirômetros foram mantidos em banho-maria a 65 °C ± 2 °C por cerca de 5 minutos. A leitura do teor de gordura foi realizada diretamente na escala graduada do butirômetro, sendo os resultados expressos em porcentagem de gordura, % m m⁻¹ (AOAC, 2019c).

3.4.2.5 Gordura por Mojonnier

A determinação do teor de lipídios de amostras com alto teor de açúcar, como produtos concentrados, foi realizada pelo método de *Mojonnier*, um método gravimétrico baseado na extração da gordura por meio de solventes orgânicos, amplamente empregado na análise de produtos lácteos. No presente trabalho, esse método foi aplicado para a quantificação de lipídios em amostras de leite condensado, mistura láctea condensada e doce de leite, seguindo a metodologia oficial descrita pela AOAC de nº 989.05 de 2019.

Inicialmente, entre 2 g a 5 g da amostra, previamente homogeneizada e avolumada para um balão de 10 mL, foram transferidas para um frasco extrator do tipo *Mojonnier*. Em seguida, adicionou-se 2,0 mL de hidróxido de amônio concentrado, 25% m m⁻¹, procedendo a agitação suave. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de álcool etílico a 95% v v⁻¹. Sob agitação manual cuidadosa, procedeu-se à extração da gordura pela adição de 25 mL de éter etílico, seguida de agitação vigorosa por cerca de 1 minuto. Em seguida, adicionou-se 25 mL de éter de petróleo, repetindo-se a agitação por mais 1 minuto. O sistema foi então deixado em repouso por 30 minutos até completa separação das fases (AOAC, 2019d).

A fase orgânica superior, contendo os lipídios dissolvidos, foi cuidadosamente transferida para um balão de fundo redondo previamente seco em estufa e pesado. O procedimento de extração foi repetido duas vezes adicionais, utilizando-se 5 mL de álcool etílico a 95% v v⁻¹, 15 mL de éter etílico e 15 mL de éter de petróleo na segunda extração, repetindo-se o mesmo procedimento na terceira extração, omitindo-se apenas o álcool etílico, de modo a assegurar a completa remoção da fração lipídica da amostra (AOAC, 2019d).

As frações orgânicas combinadas foram submetidas à evaporação dos solventes por rotaevaporação, até a eliminação visível dos solventes. Em seguida, o recipiente foi levado à estufa, marca 7Lb, modelo SSAi, a 102 °C ± 2 °C por cerca de 60 minutos, visando à remoção completa de resíduos voláteis. Após essas etapas, o frasco foi transferido para um dessecador, onde permaneceu até atingir a temperatura ambiente, sendo então pesado. O ciclo de secagem e pesagem foi repetido até a obtenção de massa constante.

O teor de lipídios foi determinado por diferença de massa, antes e após o processo extrativo, sendo os resultados expressos em porcentagem de gordura, m m⁻¹, em relação à massa da amostra analisada, conforme descrito na Equação 12 (AOAC, 2019d).

$$\% \text{ gordura } (m m^{-1}) = \frac{m_f - m_b}{m_a} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

Onde:

m_f : Representa a massa do balão após a retirada do solvente, permanecendo apenas a gordura da amostra (g);

m_b : Representa a massa do balão previamente seco e pesado (g);

m_a : Representa a massa da amostra pesada para a realização da análise (g).

3.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados experimentais obtidos a partir das análises das frações proteicas foram inicialmente organizados e tratados por meio do software *Origin*, utilizado para a construção dos gráficos referentes à distribuição das frações proteicas nas diferentes matrizes lácteas estudadas. O software possibilitou a visualização clara das tendências e variações observadas nos resultados analíticos, sendo amplamente empregado em estudos científicos. Nos dados composicionais foram aplicados a análise de variância (ANOVA) e o teste de *Tukey* a 5% de significância ($p < 0,05$) a partir do software (Originlab Corporation, 2025).

A precisão do método foi avaliada por meio dos parâmetros de repetibilidade e reprodutibilidade, conforme as diretrizes estabelecidas pela norma ISO 5725 e ISO 5725-2:1994. Para ambas as condições, foi calculado o coeficiente de variação (CV%), utilizado como principal indicador da dispersão relativa dos resultados. O critério de aceitação do coeficiente de variação seguiu recomendações adotadas em validação de métodos analíticos, considerando-se valores de $CV \leq 5\%$ como indicativos de excelente precisão, enquanto valores superiores a esse limite indicam maior variabilidade do método (International Organization For Standardization, 1994a; 1994b).

Dessa forma, a utilização de ferramentas gráficas e estatísticas permitiu uma avaliação da precisão, reprodutibilidade e comparabilidade dos métodos empregados na determinação das frações proteicas das matrizes lácteas analisadas.

4 RESULTADOS

Nesta seção, são apresentados os resultados obtidos, os quais foram organizados e discutidos de acordo com as quatro etapas principais do desenvolvimento do trabalho.

4.1 OTIMIZAÇÃO ANALÍTICA POR *KJELDAHL*

A parte 1 deste trabalho teve como foco na otimização das condições analíticas para a aplicação do método *Kjeldahl* em matrizes lácteas concentradas.

Os procedimentos de preparo de amostras descritos nas metodologias oficiais disponíveis na literatura científica foram originalmente desenvolvidos para análise de leite cru. Com base nisso, tornou-se necessária adaptações metodológicas visando à reprodutibilidade do método *Kjeldahl* quando aplicado em outras matrizes lácteas, como o leite condensado integral e o doce de leite tradicional. Apesar de compartilharem a mesma base, o leite, tais amostras apresentam características distintas, com diferenças na viscosidade, teor de carboidratos e lipídios, como podemos observar na Tabela 1. Essas diferenças interferem de forma significativa na avaliação do teor proteico e justifica a necessidade da otimização das condições analíticas.

Tabela 1 - Informações nutricionais de amostras comerciais.

Amostra (100 g) constituintes	LC3*	DL3**
Carboidratos totais (g)	56	52
Proteínas (g)	7,2	8,3
Gorduras totais (g)	8,2	7,7

*LC3: Leite condensado integral, marca 3.

**DL3: Doce de leite tradicional, marca 3.

Fonte: Próprio autor (2026).

Diante dessas particularidades das matrizes avaliadas, tornou-se necessária adaptação das condições iniciais de análise para determinação do teor de proteína. Em função da maior consistência e do elevado teor de sólidos, especialmente de proteínas em comparação ao leite cru, foi necessário o preparo de soluções de partida adequadas, de modo a viabilizar a análise e garantir a eficiência do processo de digestão. A adequação das soluções foi realizada com base no teor de proteína informado nos rótulos dos

produtos. Todas as amostras foram preparadas uma única vez e as alíquotas foram analisadas em três tubos micro *Kjeldahl* independentes, caracterizando a repetibilidade do processo (n=3).

Para o ajuste das condições analíticas, foram considerados tanto a projeção do analito durante o processo de digestão bem como a faixa de nitrogênio requerida para análises no sistema semi-micro, compreendida entre 0,1 mg a 2 mg de nitrogênio por tubo, pontos fundamentais para a quantificação adequada. No preparo da fração de nitrogênio total, seguiu-se o mesmo conceito de diluição descrita para o leite, conforme recomendada por Wolfschoon-Pombo, se adequando na faixa do semi-micro (Wolfschoon-Pombo, 1980).

Diante disso, foram avaliadas diferentes diluições para as amostras de doce de leite e leite condensado. Para o leite condensado, foram avaliadas diluições de 5%, 10% e 20% m m⁻¹, e todas apresentaram resultados satisfatórios e semelhantes durante todo o processo. Entretanto, a escolha da melhor diluição foi baseada no desvio padrão, que demonstrou uma tendência de aumento com o incremento da concentração da solução de partida (Skoog; West, 2014). Diante disso, optou-se pela utilização da solução inicial de 5% m m⁻¹ para essa matriz.

Para o doce de leite, foram avaliadas soluções de 10% e 20% m m⁻¹, uma vez que a de 5% m m⁻¹ já havia apresentado resultados insatisfatórios. Os preparos testados obtiveram resultados semelhantes e com desvios próximos. Diante disso, a escolha baseou-se na quantidade de alíquota no tubo, uma vez que partindo de uma solução de 10% m m⁻¹, seria possível inserir um maior volume de alíquota no dobro de amostra se comparado à solução 20% m m⁻¹.

As frações de NCN e NPN, tiveram soluções de partida de concentração de 35% m m⁻¹ de leite condensado e de doce de leite, pois maiores concentrações apresentaram baixa solubilidade. Ademais, a solução de 35% m m⁻¹ representou a concentração mínima para que ambas as frações avaliadas se mantivessem na faixa de nitrogênio determinada pelo método.

Com base nesses parâmetros, os volumes e as concentrações das amostras foram ajustados, resultando nos valores apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições analíticas e teor de nitrogênio obtido para as diferentes frações nitrogenadas de leite cru, leite condensado e doce de leite.

Amostra	Fração nitrogenada	Solução inicial % m m ⁻¹	Alíquota no tubo / g	Nitrogênio ± dpa /mg
Leite cru	NT	5	5,0	1,06 ± 0,05
	NCN - AD	Leite cru	2,0	0,74 ± 0,03
	NCN - AOAC	Leite cru	1,8	0,87 ± 0,02
	NPN	Leite cru	5,0	0,35 ± 0,01
Leite condensado (LC3)	NT	5	2,5	1,48 ± 0,05
	NCN - AD	35	2,1	0,24 ± 0,03
	NCN - AOAC	35	2,6	0,39 ± 0,01
	NPN	35	3,5	0,17 ± 0,01
Doce de leite (DL3)	NT	10	1,0	1,39 ± 0,04
	NCN - AD	35	2,0	0,22 ± 0,01
	NCN - AOAC	35	2,5	0,51 ± 0,01
	NPN	35	2,5	0,15 ± 0,01

NT: nitrogênio total; **NCN-AD:** fração nitrogenada não caseínica por *Aschaffenburg e Drewry* (NCN = α -LA + β -LG + BSA + NPN); **NCN-AOAC:** fração nitrogenada não caseínica pela Associação de Químicos Analíticos Oficiais (NCN = proteínas séricas + NPN); **NPN:** fração nitrogenada não proteica; **Nitrogênio:** quantidade em massa de nitrogênio presente no tubo; **dpa:** desvio padrão amostral.

Fonte: Próprio autor (2026).

Tendo em vista que determinadas amostras podem apresentar melhor desempenho analítico quando ajustadas à faixa ideal de nitrogênio, observou-se que valores superiores aos recomendados na Tabela 2 resultaram em inconsistências durante a etapa inicial do método, como a projeção de amostra na digestão e valores fora da faixa de 0,1-2,0mg N/tubo.

As diferenças entre os métodos de NCN, AD e AOAC, puderam ser evidenciadas com maiores valores em massa de nitrogênio pela metodologia descrita na AOAC em relação ao método de AD, sendo esse fato independente da matriz a ser avaliada. Pode se ainda concluir que as diferentes concentrações das soluções iniciais e massa das alíquotas evidencia a influência da complexidade das matrizes frente às condições analíticas. No caso da fração nitrogenada de NPN, observou-se uma menor contribuição relativa, conforme esperado (AOAC, 2012a; Aschaffenburg; Drewry, 1959).

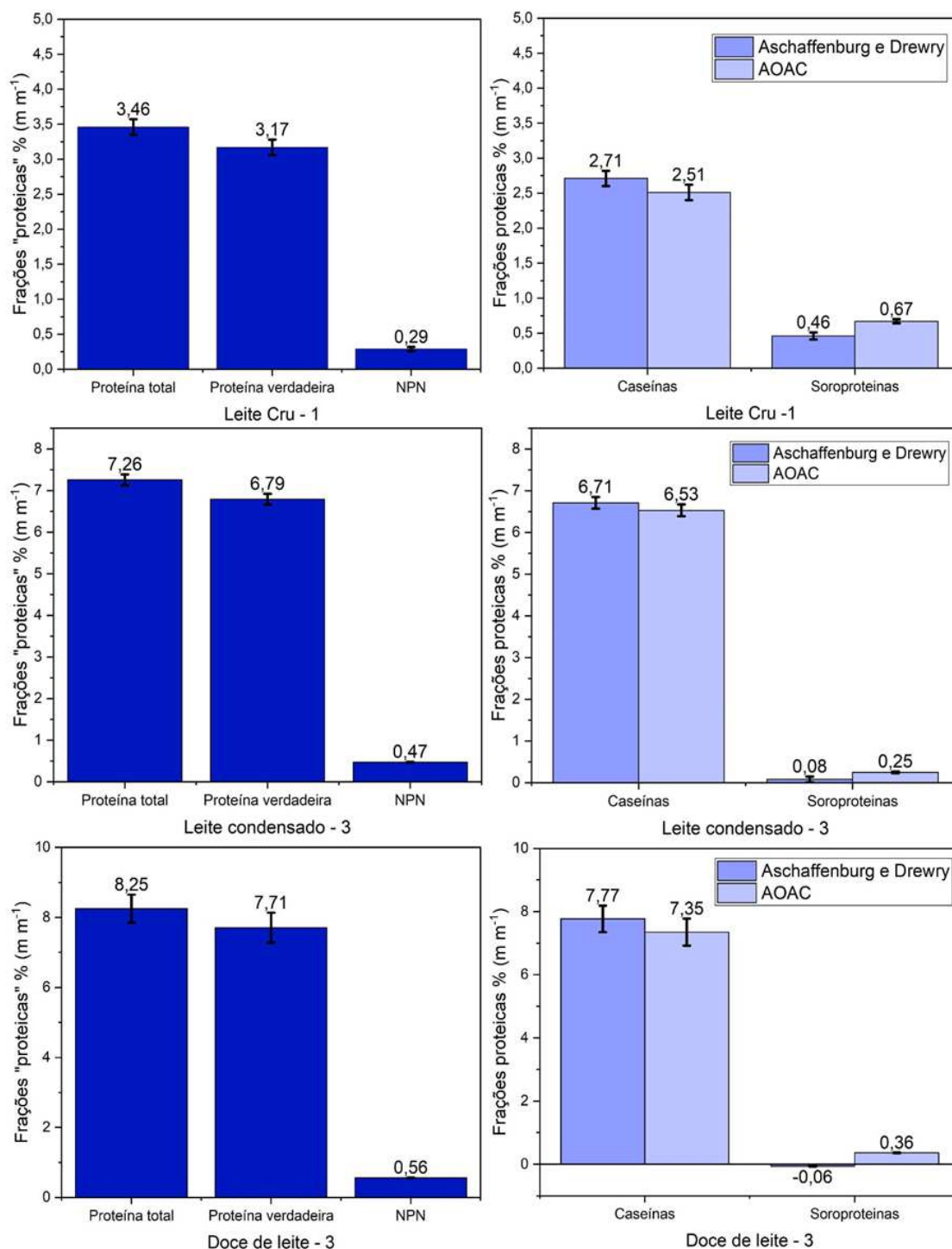
4.2 FRAÇÕES NITROGENADAS E PERFIL PROTEICO

Baseando-se nos ajustes analíticas definidos na parte 1, as amostras de leite condensado integral, doce de leite tradicional e leite cru, foram avaliadas em uma nova etapa de análises, definindo a parte 2. Cada amostra foi analisada em três repetições e, cada repetição em triplicata, garantindo assim a robustez e a confiabilidade.

Nessa segunda parte do trabalho, foi preconizado a avaliação das frações nitrogenadas das amostras lácteas concentradas, bem como o leite cru, sendo esse uma amostra referência. Foi avaliado também o perfil proteico por SDS-PAGE, bem como avaliação composicional das amostras comerciais.

A primeira avaliação consiste numa comparação das frações “proteicas” obtidas a partir das frações nitrogenadas experimentais, como proteína total, e nitrogênio não proteico. A outra comparação foi realizada entre as frações proteicas obtidas por método indireto, como proteína verdadeira, caseínas e proteínas do soro. Para obtermos as frações “proteicas” a partir das frações nitrogenadas é necessário a multiplicação do fator de conversão (6,38). Para a realização dos cálculos indiretos, foram utilizadas as equações 7, 8 e 9, descritas na seção 3.4.1.1. A Figura 9 traz as frações proteicas das amostras avaliadas.

Figura 9 - Frações "proteicas" de leite cru, leite condensado integral e doce de leite tradicionais comerciais (n = 3) em % m m⁻¹.



Proteína total: obtida através da fração nitrogenada total; **proteína verdadeira:** obtida pela diferença entre a fração nitrogenada total com a fração nitrogenada não proteica; **caseínas:** obtida pela diferença entre a fração nitrogenada total com a fração nitrogenada não caseínica; **soroproteínas:** obtida pela diferença da fração nitrogenada não caseínica com a fração nitrogenada não proteica.

Fonte: Próprio autor (2026).

De acordo com a Instrução Normativa de nº 76 de 26 de novembro de 2018 do MAPA, dentre os parâmetros mencionados, podemos destacar o teor de proteínas mínimo

que é de 2,9% m m⁻¹. A partir dos resultados expostos na Figura 9, podemos destacar que o leite cru avaliado segue a norma supracitada (Brasil, 2018a). Ambos os produtos lácteos concentrados avaliados, leite condensado integral e doce de leite tradicional, atendem as legislações específicas no quesito avaliado experimentalmente, o teor de proteína total. Observa-se que os valores rotulados, expostos na Tabela 1, (7,2% m m⁻¹ para leite condensado integral e 8,3% m m⁻¹ para doce de leite tradicional), são bem similares aos obtidos na análise proteica, (7,26% m m⁻¹ para leite condensado integral e 8,25% m m⁻¹ para doce de leite tradicional), sendo essa pequena diferenciação associada ao desvio de conformidade de rótulos de produtos finais (Brasil, 1997; 2018b; Fabris; Santos; Stefani, 2024).

A normativa não preconiza as frações proteicas avaliadas, mas é de grande importância seu entendimento e compreensão. Na literatura científica, para leite cru, a fração “proteica” de NPN representa cerca de 5% a 6% do conteúdo total de nitrogênio, mas, no leite avaliado, foi observado que a fração de NPN representa cerca de 8,4%, podendo este valor estar atrelado a fatores fisiológicos e nutricionais, incluindo processos de degradação proteica (Depeters; Cant, 1992; Rowland, 1938).

A fração de NPN encontrada nas amostras lácteas concentradas, no leite condensado integral e no doce de leite tradicional, ainda é muito pouco explorada na literatura científica. No caso do doce de leite, não encontramos uma referência nas principais base de dados. Na dissertação de mestrado de Paula Nunes Mendes, a autora avalia nas amostras de leite condensado uma faixa de NPN compreendida entre 0,196% m m⁻¹ a 0,248% m m⁻¹ e, se compararmos o valor encontrado experimentalmente nesse trabalho, que foi de 0,074% m m⁻¹ (convertendo proteína para nitrogênio), pode se dizer que o conteúdo encontrado foi bem inferior ao relatado em trabalho científico para a mesma base láctea. Essa diferenciação pode estar associada pelos diferentes processamentos e tempo de armazenamento do produto final (Mendes, 2012).

Na comparação dos métodos referentes à fração de NCN, temos que, a precipitação com o uso do sulfato de sódio, pelo método de NCN-AD e a precipitação com ácido acético, pelo método NCN-AOAC retornam valores diferentes num mesmo grupo de proteínas avaliado, que no caso seriam o grupo das caseínas (CAS) e o das proteínas do soro (SP). Essas diferenças estão intimamente relacionadas ao mecanismo químico envolvido em cada método. Na metodologia descrita por *Aschaffenburg e Drewry* (AD) a separação das proteínas ocorre por efeito *salting-out*, onde ocorre o

aumento da força iônica do meio com a presença da solução supersaturada de sulfato de sódio, ocasionando à desidratação das proteínas e conseqüentemente o favorecimento das interações hidrofóbicas de proteína-proteína. O mecanismo químico não se relaciona com as cargas das moléculas em questão e, no caso de matrizes concentradas e termicamente processadas, como o doce de leite e o leite condensado, pode ocasionar no meio o fenômeno de coprecipitação de proteínas globulares do soro que se associam à agregados de caseínas desnaturados, e, com isso, justificar os maiores valores obtidos da fração caseínica (CAS) e, a subestimação da fração das proteínas do soro (SP) (Aschaffenburg; Drewry, 1959; Wingfield, 1998).

Na avaliação da fração caseínica pela metodologia AOAC, temos que a separação se baseia na precipitação seletiva das caseínas a partir do ajuste de pH para o ponto isoelétrico médio das caseínas ($\approx 4,6$). Isso promove a neutralização das cargas elétricas e a perda de repulsão eletrostática entre as micelas e, as proteínas do soro, que nesse caso possuem estruturas globulares e alta solubilidade em meio ácido, são as proteínas que compõem a fração sobrenadante. Pode concluir nessa comparação metodológica que, a obtenção da fração de NCN pela metodologia da AOAC é mais adequada, tendo maior seletividade química frente às diferentes frações proteicas (AOAC, 2012a).

Na fabricação dos produtos lácteos concentrados, como o leite condensado integral e o doce de leite tradicional, não há um acréscimo real na concentração de caseínas, o que de fato ocorre no meio é a desnaturação principalmente das proteínas do soro, ocasionada pelo estresse térmico. Estruturalmente, acontece o desdobramento das proteínas do soro, afetando os níveis quaternário, terciário e secundário das proteínas (Wolfschoon-Pombo; Fernandes; Granzinolli, 1982).

Uma das conseqüências ocasionadas pela desnaturação proteica é a formação de complexos entre as proteínas do soro e as caseínas, mais especificamente entre a κ -caseína e os grupos sulfidrilas ($-SH$), esses expostos nas estruturas das proteínas do soro desnaturadas como a β -lactoglobulina ($\beta - LG$). Os complexos formados são coprecipitados juntamente com as caseínas desnaturadas durante o processo de separação, aumentando a fração de caseínas e conseqüentemente reduzindo as proteínas do soro (Larson; Roller, 1955; Wolfschoon-Pombo; Fernandes; Granzinolli, 1982).

Uma das proteínas séricas que é mais sensível frente aos tratamentos térmicos é β -lactoglobulina ($\beta - LG$), que desempenha um papel crucial nas alterações do perfil

proteico. A desnaturação e posterior interação com outras proteínas do meio, podem ser moduladas por diferentes fatores, como pH, concentração de lactose, presença de íons cálcio e de outros sais (Larson; Rolleri, 1955; Wolfschoon-Pombo; Fernandes; Granzinoli, 1982).

Os parâmetros estatísticos de repetibilidade (r) e reprodutibilidade (R) são cruciais para a validação da precisão analítica do método. Logo, faz-se necessário o uso em todos os métodos aplicados durante a obtenção das frações nitrogenadas (NT, NCN-AD, NCN-AOAC e NPN) a partir das diferentes matrizes lácteas. Os parâmetros estatísticos avaliados nos conferem a validação do método, bem como a criticidade dos valores experimentais obtidos (International Organization For Standardization, 1994b).

A repetibilidade (r) é utilizada para representar a variação dos resultados obtidos nas mesmas condições experimentais como: o mesmo analista, o mesmo equipamento e o mesmo procedimento em um curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade (R), conforme descrita na ISO 5725-2, define-se como a variabilidade dos resultados sob condições experimentais diferentes, entre laboratórios. No referido trabalho, o parâmetro de reprodutibilidade (R) foi aplicado no formato intralaboratorial, considerando as análises feitas em dias diferentes, em função do tempo, preparo de reagentes, variações ambientais e instrumentais, a fim de avaliar a robustez do método, onde não avaliamos o formato interlaboratorial, este descrito na ISO 5725-2 (International Organization For Standardization, 1994b).

Foram avaliados adicionalmente os coeficientes de variação (CV%) relacionados com os parâmetros de repetibilidade (r) e reprodutibilidade (R) como indicadores relativos de precisão, nos quais permitem a comparação direta da variabilidade entre as frações e as matrizes lácteas distintas. Valores baixos de CV% são indicativos de maior precisão do método e, valores elevados, sinalizam uma maior sensibilidade, relacionadas às variações operacionais. Na normativa ISO 5725-2, encontra-se todos as equações envolvidas para a obtenção dos parâmetros estatísticos em questão. Na Tabela 3, estão expostos os valores calculados de repetibilidade (r), reprodutibilidade (R) e seus respectivos CV% (International Organization For Standardization, 1994b).

Tabela 3 -Parâmetros de repetibilidade (r), reprodutibilidade (R) e CV% das frações nitrogenadas em leite cru, leite condensado e doce de leite (ISO 5725-2:1994).

Produto	Fração	Limite		CV%	
		repetibilidade	reprodutibilidade	repetibilidade	reprodutibilidade
Leite cru (Lc1)	NT	0.19	0.28	2.60	3.84
	NCN-AD	0.03	0.08	1.72	4.93
	NCN-AOAC	0.04	0.04	2.39	2.39
	NPN	0.01	0.01	2.16	2.16
Leite condensado Integral (LC3)	NT	0.38	0.38	1.87	1.87
	NCN-AD	0.04	0.22	2.91	14.45
	NCN-AOAC	0.06	0.06	3.06	3.06
	NPN	0.01	0.01	0.71	0.71
Doce de leite tradicional (DL3)	NT	0.27	1.37	1.18	5.94
	NCN-AD	0.04	0.05	2.83	3.27
	NCN-AOAC	0.02	0.03	0.96	1.09
	NPN	0.03	0.03	1.99	2.02

NT: fração nitrogenada total; **NCN-AD:** fração não caseínica obtida pelo método de *Aschaffenburg e Drewry* (AD); **NCN-AOAC:** fração não caseínica obtida pelo método da AOAC; **NPN:** fração de nitrogênio não proteico. **r:** repetibilidade; **R:** reprodutibilidade; **CV%:** Coeficiente de variação.

Fonte: Próprio autor (2026).

Na avaliação dos limites de r e de R e dos seus respectivos CV%, vimos que há uma boa precisão global do método para a determinação da fração de NT e da fração de NPN em todas as matrizes lácteas avaliadas, sendo seus respectivos CV% inferiores a 4%. Vimos que o NCN-AOAC apresentou maior robustez, com valores de CV% baixos e ainda bem próximos, se comparados entre as matrizes lácteas avaliadas. A fração de NCN-AD obteve CV% de 14,45% sendo um indicativo de baixa reprodutibilidade nessa matriz, possivelmente pelo mecanismo de precipitação por *salting-out* bem como às condições de preparo e composição. Pode-se concluir que dentre os métodos avaliados para a fração de NCN, o método descrito pela AOAC torna-se o mais adequado a ser aplicado em produtos lácteos concentrados e termicamente processados.

O perfil proteico das amostras de leite condensado integral e doce de leite tradicional foi avaliado por SDS-PAGE. Partimos das mesmas soluções que foram analisadas anteriormente.

A partir do preparo inicial das amostras, estas foram submetidas à eletroforese com o objetivo de identificar o perfil proteico de cada tratamento. As amostras de leite condensado e doce de leite foram inicialmente processadas com o mesmo protocolo

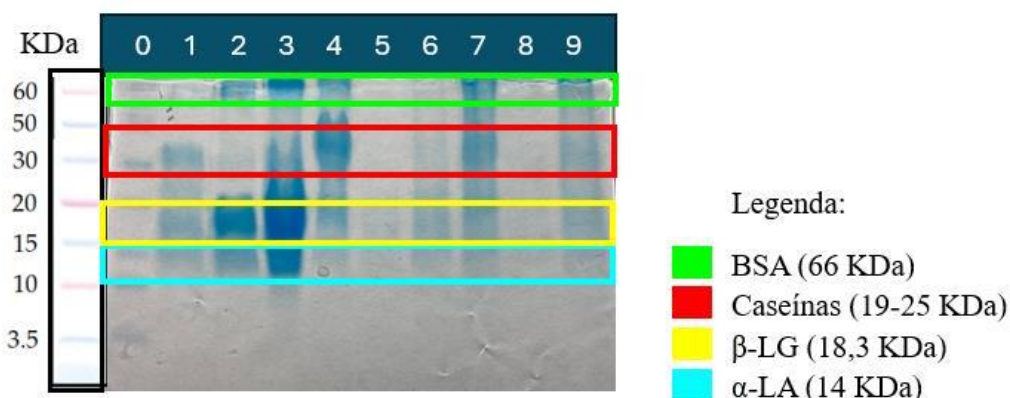
utilizado para as amostras de leite *in natura*. No entanto, não apresentaram bandas visíveis, possivelmente em decorrência do baixo teor de proteínas do soro nas frações analisadas e da presença de interferentes, como os sais, na matriz.

Diante dos resultados insatisfatórios, foram realizadas adaptações nos protocolos para SDS-PAGE, com o intuito de otimizar o perfil eletroforético obtido. Considerando o teor reduzido de proteínas detectado, ajustes como a simples remoção de sais e a precipitação proteica convencional não foram suficientes para viabilizar a continuidade da análise (Laemmli, 1970).

Como alternativa, optou-se pela concentração da solução tampão em 4×, esta constituída de 1,36 mL de água, 1,25 mL de tampão TRIS-HCl 2M (pH 6,8), 4 mL de glicerol, 0,8 g de SDS, 2,55 mL de 2-mercaptoetanol, 40 mg de azul de bromofenol, visando aumentar a sensibilidade da detecção e a definição das bandas proteicas no gel. A composição do tampão de amostra seguiu o princípio clássico de *Laemmli* e a proporção adotada foi de 3 partes de amostra para 1 parte do tampão de amostra.

A partir de testes preliminares, foi realizado dois diferentes preparos de amostra da fração de NCN-AOAC para a avaliação na análise de SDS-PAGE: O primeiro preparo seguiu exatamente o método descrito pela AOAC para a análise da fração de NCN e, o segundo preparo partiu-se de uma adaptação do método, mas sem o uso da água para ajuste o volume final da mistura de 100 mL, tendo como objetivo uma maior concentração da fração proteica após a precipitação (AOAC, 2012a). Na Figura 10, podemos avaliar o perfil proteico da fração proteica total [PT = NT x 6,38], da fração de proteína não caseínica obtida a partir do método da AOAC [P(NCN) = NCN x 6,38], das amostras de leite, leite condensado integral e doce de leite tradicional.

Figura 10 - Perfil proteico por SDS-PAGE das frações de PT e P(NCN)-AOAC das amostras de leite, leite condensado e doce de leite.



0: padrão de proteínas recombinantes *Novex Sharp*; **1:** fração proteica total (PT) do leite; **2:** fração de proteínas do soro do leite [P(NCN)-AOAC]; **3:** fração de proteínas do soro do leite sem diluição, adaptado [P(NCN)-AOAC adaptado]; **4:** fração proteica total (PT) do leite condensado integral; **5:** fração de proteínas do soro do leite condensado integral [P(NCN)-AOAC]; **6:** fração de proteínas do soro do leite condensado integral sem diluição, adaptado [P(NCN)-AOAC adaptado]; **7:** fração proteica total (PT) do doce de leite; **8:** fração de proteínas do soro do doce de leite tradicional [P(NCN)-AOAC]; **9:** fração de proteínas do soro do doce de leite tradicional sem diluição, adaptado [P(NCN)-AOAC adaptado].
Fonte: Próprio autor (2026).

A partir da avaliação das bandas encontradas nos poços de número 1, 4 e 7 no gel da Figura 10, referentes a proteína total do leite, leite condensado integral e doce de leite tradicional, respectivamente, vimos bandas proteicas compatíveis com frações de BSA, caseínas, β -LG e de α -LA, com intensidades diferentes, nas quais podemos associar com os valores encontrados nas frações proteicas por *Kjeldahl* das respectivas amostras.

Nas bandas numeradas de 2, 5 e 8, temos as frações de proteínas do soro das amostras de leite, leite condensado integral e, doce de leite tradicional respectivamente e, observou-se a presença predominantes das frações de proteínas do soro (~18 kDa e ~14 kDa) e, não foram detectadas bandas compatíveis com as frações de caseínas (19-25 kDa) nas condições analisadas.

Por outro lado, nos poços de números 6 e 9, referentes às frações de proteínas do soro sem diluição, conforme a adaptação do preparo de amostra de NCN pela AOAC para leite cru, [P(NCN)-AOAC], verificou-se à presença das proteínas do soro e também frações de caseínas, sendo mais evidente no poço de número 9. Isso mostra que há necessidade de um ajuste na metodologia da separação das proteínas do soro frente às caseínas, nas amostras lácteas concentradas, como vimos nas amostras de leite condensado integral e do doce de leite tradicional. No caso do leite, no poço de número 3, a amostra teve interferências (amostra “arrastada”) logo, não é possível inferir se

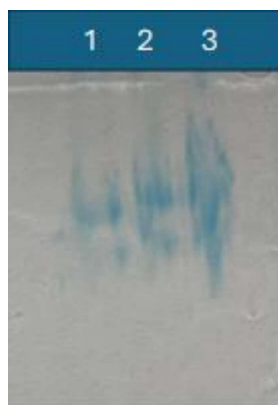
realmente nessa encontramos bandas referentes às caseínas, sendo necessário uma nova avaliação (Anema; Li, 2003).

É importante mencionar que tanto as proteínas do soro quanto as caseínas, proteínas desnaturadas encontradas nas amostras de leite condensado integral e doce de leite tradicional estão menos disponíveis se comparado com as frações proteicas encontradas nas amostras de leite cru, pois elas já foram expostas a diferentes tratamentos térmicos durante seu processamento industrial (Corredig; Dalgleish, 1998).

Dessa forma, a adaptação do preparo de amostra da fração de NCN pelo método da AOAC para o SDS-PAGE, sem a diluição mostrou-se mais adequada para a caracterização das bandas proteicas nas amostras de leite condensado integral e doce de leite tradicional. Mas, é visto que a separação das proteínas do soro das caseínas ainda necessita de aprimoramento, pois ocasiona uma quantificação das proteínas do soro errônea. Esse comportamento pode estar relacionado à coprecipitação, conforme discutido anteriormente neste trabalho, uma vez que os complexos formados durante o processamento térmico dessas amostras podem apresentar tamanhos e conformações estruturais diferentes de suas respectivas proteínas em sua forma nativa (AOAC, 2012a; Rowland, 1938).

Além da avaliação da fração de NCN-AOAC, foi realizado o estudo do perfil proteico da fração de NCN pelo método de AD (NCN-AD) nas amostras de leite cru, leite condensado integral e doce de leite tradicional. Na Figura 11 temos expostos os perfis das referidas amostras (Aschaffenburg; Drewry, 1959).

Figura 11 - Perfil proteico por SDS-PAGE das frações P(NCN)-AD das amostras de leite, leite condensado e doce de leite.



1: fração de proteínas do soro do leite [P(NCN)-AD]; **2:** fração de proteínas do soro do leite condensado integral [P(NCN)-AD]; **3:** fração de proteínas do soro do doce de leite tradicional [P(NCN)-AD];
Fonte: Próprio autor (2026).

Na avaliação da Figura 11, observou-se que as proteínas do soro obtidas a partir metodologia de *Aschaffenburg e Drewry* não foram compatíveis com a análise de SDS-PAGE. Esse comportamento pode ser atribuído ao aumento considerável de íons presentes no meio, provenientes do agente precipitante, ocasionando interferência na migração eletroforética (Aschaffenburg; Drewry, 1959; Laemmli, 1970).

Independentemente da amostra avaliada, as bandas apresentaram baixa resolução e efeito de “arraste” no gel, indicando necessidade de ajustes no preparo de amostra para possibilitar a avaliação do perfil eletroforético das frações de proteínas do soro quando se utiliza a metodologia de *Aschaffenburg e Drewry* (Aschaffenburg; Drewry, 1959).

4.3 AVALIAÇÃO DE PRODUTOS CONCENTRADOS

Nessa terceira parte do trabalho, foram avaliadas três marcas diferentes (1, 2 e 3) de cada um dos diferentes produtos lácteos concentrados, que são leite condensado integral, doce de leite tradicional e mistura láctea condensada. Na Tabela 4, podemos visualizar uma parte do rótulo dos produtos comerciais avaliados.

Tabela 4 - Informações nutricionais de amostras comerciais de leite condensado integral, doce de leite tradicional e mistura láctea condensada (valores expressos em g 100 g⁻¹).

Amostra (100 g) Constituintes	LC1*	LC2	LC3	DL1**	DL2	DL3	ML1***	ML2	ML3
Carboidratos totais (g)	55	55	56	55	55	52	58	63	62
Proteínas (g)	8,0	7,5	7,2	6,5	6,5	8,3	3,2	3,0	3,6
Gorduras totais (g)	8,0	8,0	8,2	6,2	6,2	7,7	9,0	2,0	2,6

*LC: leite condensado integral, 3 marcas diferentes (1,2 e 3);

** DL: doce de leite tradicional, 3 marcas diferentes (1, 2 e 3);

*** ML: mistura láctea condensada, 3 marcas diferentes (1,2 e 3).

Fonte: Próprio autor (2026).

A partir da Tabela 4, observa-se que dentre os três grupos de produtos, apresentam diferenças nos teores de proteínas, carboidratos e gorduras totais, as quais podem impactar na quantificação por *Kjeldahl* e caracterização por SDS-PAGE, em função das diferentes matrizes avaliadas.

Em todas as amostras foram determinados os principais parâmetros de composição físico-química, como teor de proteínas e frações proteicas [PT, P(NCN)-AOAC, P(NPN)], teor de gordura (*Gerber* ou *Mojonnier*), sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix), extrato seco total e, resíduo mineral fixo (cinzas). Os valores obtidos estão expostos na Tabela 5, dada a seguir.

Tabela 5 - Parâmetros de composição físico-química das amostras de leite, leite condensado e doce de leite (valores expressos em % $m m^{-1}$, exceto sólidos solúveis em $^{\circ}$ Brix).

Amostra	Marca	Extrato seco total	Sólidos solúveis	Resíduo mineral fixo	Gordura
Leite condensado integral	1	72,68 \pm 0,37 ^{a*}	70,13 \pm 0,21 ^{ab}	1,71 \pm 0,05 ^b	7,40 \pm 0,20 ^a
	2	72,44 \pm 0,24 ^a	68,80 \pm 0,85 ^a	1,60 \pm 0,02 ^a	6,96 \pm 0,10 ^a
	3	72,66 \pm 0,12 ^a	70,50 \pm 0,35 ^b	1,61 \pm 0,01 ^a	7,26 \pm 0,17 ^a
Doce de leite tradicional	1	64,74 \pm 0,67 ^b	62,13 \pm 1,76 ^a	1,65 \pm 0,01 ^b	5,86 \pm 0,46 ^a
	2	64,05 \pm 0,65 ^{ab}	62,77 \pm 0,21 ^a	1,54 \pm 0,02 ^a	5,84 \pm 0,94 ^a
	3	63,15 \pm 0,30 ^a	63,17 \pm 0,06 ^a	1,82 \pm 0,02 ^c	5,53 \pm 0,62 ^a
Mistura láctea condensada	1	70,77 \pm 0,22 ^c	63,83 \pm 0,76 ^a	1,60 \pm 0,04 ^c	7,84 \pm 0,03 ^c
	2	66,08 \pm 0,24 ^a	64,57 \pm 0,40 ^a	1,08 \pm 0,01 ^a	1,99 \pm 0,14 ^a
	3	69,19 \pm 0,42 ^b	68,27 \pm 0,49 ^b	1,28 \pm 0,01 ^b	3,00 \pm 0,13 ^b

*Letras diferentes na mesma coluna (dentro de cada amostra) indicam diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Valores expressos em média \pm desvio padrão amostral.

Fonte: Próprio autor (2026).

As diferenças encontradas em cada um dos grupos de produtos refletem nas particularidades de formulação bem como nas exigências regulatórias específicas. No caso das amostras de leite condensado integral, temos que os valores de extrato seco total e de sólidos solúveis, foram diretamente relacionados com o teor de carboidratos elevado nos produtos. O teor de umidade, variando entre 72,44% $m m^{-1}$ - 72,68% $m m^{-1}$, estão em conformidade com a legislação, no qual o valor mínimo permitido é de 70% $m m^{-1}$. O teor de gordura dessas amostras atingiu o valor mínimo estabelecido pela legislação brasileira, de 7,0% $m m^{-1}$ e dentro da faixa de 20% pra mais ou para menos encontrada nos rótulos dos produtos comerciais. Os teores de cinzas foram inferiores a 2% $m m^{-1}$, em conformidade com a legislação. Entre as marcas de leite condensado integral estão relacionadas com as diferentes formulações dos produtos (Brasil, 2018b).

Nas amostras comerciais de doce de leite tradicional, os teores de extrato seco total e sólidos solúveis encontrados são coerentes com a elevada concentração de açúcares no meio. Os teores médios de gordura estão próximos ao valor mínimo permitido na legislação (6% $m m^{-1}$). No caso do limite máximo de umidade de 30% $m m^{-1}$, valor

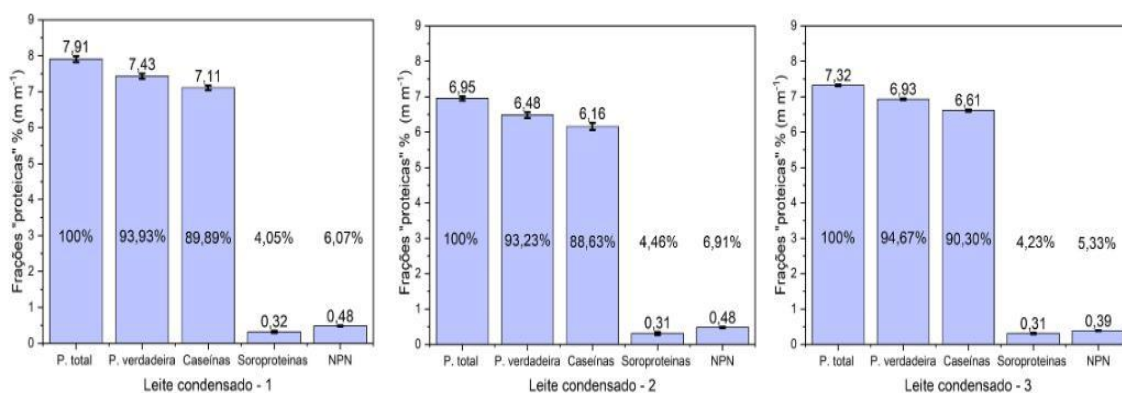
estabelecido pelo RTIQ, o teor mínimo para o extrato seco total é de $70\% \text{ m m}^{-1}$ e, é possível verificar que as amostras de doce de leite tradicional avaliadas, apresentam teores de extrato seco total abaixo do valor regulamentado, indicando não conformidade para esse parâmetro. Os teores de cinzas foram inferiores a $2\% \text{ m m}^{-1}$, em conformidade com a legislação (Brasil, 1997).

Além disso, a correlação entre sólidos solúveis ($68\text{-}70 \text{ }^\circ\text{Brix}$) e teor de carboidratos declarado ($55\text{-}56\% \text{ m/m}$) nas amostras de leite condensado (Tabelas 4 e 5) é consistente, considerando que $^\circ\text{Brix}$ quantifica sólidos dissolvidos totais, dos quais os açúcares (lactose + sacarose) são o componente majoritário. O extrato seco total ($\sim 72,5\% \text{ m/m}$) é superior aos sólidos solúveis, refletindo a contribuição de proteínas ($7\text{-}8\% \text{ m/m}$) e gorduras ($7\text{-}8\% \text{ m/m}$) não quantificados por refratometria. O doce de leite demonstra a mesma tendência em seus resultados quando comparados a valores de rotulagem.

No caso das amostras de misturas lácteas condensadas, como não há legislação específica, existem uma grande variabilidade nos parâmetros físico-químicos, como pode ser visualizado na Tabela 4 (Brasil, 1997).

As três amostras de leite condensado integral foram selecionadas a partir da composição semelhantes, tendo em sua constituição o leite integral e/ou leite em pó integral reconstituído, açúcar e lactose. Para a caracterização das frações proteicas foram realizados os preparos de amostra definidos na sessão 4.1 e os cálculos indiretos, definidos na sessão 3.4.1.1, os quais possibilitaram a construção dos gráficos apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Frações proteicas das amostras comerciais (3) de leite condensado integral em $\% \text{ m m}^{-1}$.

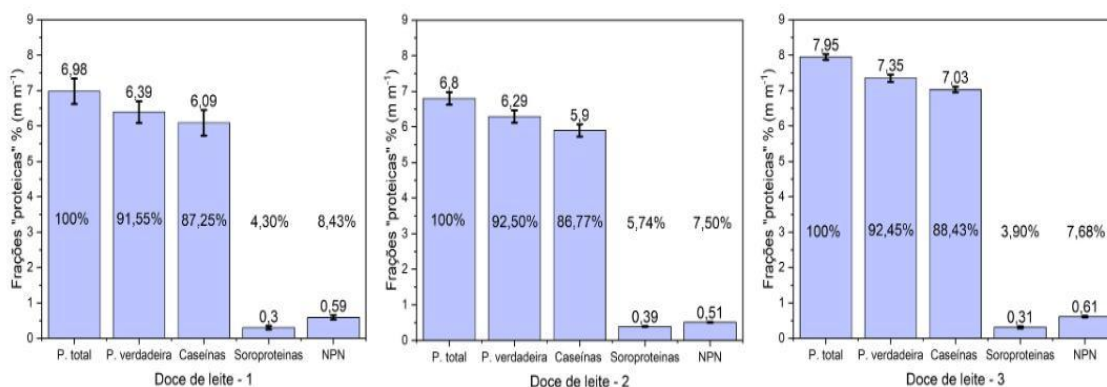


Proteína total: obtida através da fração nitrogenada total; **proteína verdadeira:** obtida pela diferença entre a fração nitrogenada total com a fração nitrogenada não proteica; **caseínas:** obtida pela diferença entre a fração nitrogenada total com a fração nitrogenada não caseínica; **soroproteínas:** obtida pela diferença da fração nitrogenada não caseínica com a fração nitrogenada não proteica; **NPN:** fração “proteica” não nitrogenada. Fonte: Próprio autor (2026).

As amostras de leite condensado integral analisadas tiveram suas frações de proteína total (PT) e proteína verdadeira (PV) comparáveis aos valores encontrados nos rótulos dos produtos. A fração “proteica” não nitrogenada (NPN) das amostras variaram de 5,3% - 6,9% do valor de PT de referência (100%), bem semelhante ao conteúdo encontrado em leite e derivados (Hotoon, 2015). Os valores encontrados na fração de “proteínas do soro”, variaram de 0,31% - 0,32% $m\ m^{-1}$, correspondendo de 4% - 4,5% da PT, mas vimos na sessão anterior que essa fração possui complexos de caseína, logo torna-se errôneo tratar pela nomenclatura somente como proteínas do soro essa fração. E, conseqüentemente, a fração descrita como caseínas terá seu valor subestimado, esse variando nesse tipo de amostra numa faixa compreendida entre 88,6% a 90% da PT.

No caso das amostras de doce de leite tradicional, os doces foram escolhidos a partir da sua composição, sendo constituídos por leite integral, açúcar, sorbato de potássio e bicarbonato de sódio. Para a caracterização das frações proteicas foram realizados os preparos de amostra definidos na sessão 4.1 e os cálculos indiretos, definidos na sessão 3.4.1.1, os quais possibilitaram a construção dos gráficos apresentados na Figura 13.

Figura 13 - Frações proteicas das amostras comerciais (3) de doce de leite tradicional em % $m\ m^{-1}$.



Proteína total: obtida através da fração nitrogenada total; **proteína verdadeira:** obtida pela diferença entre a fração nitrogenada total com a fração nitrogenada não proteica; **caseínas:** obtida pela diferença entre a fração nitrogenada total com a fração nitrogenada não caseínica; **soroproteínas:** obtida pela diferença da fração nitrogenada não caseínica com a fração nitrogenada não proteica; **NPN:** fração “proteica” não nitrogenada. Fonte: Próprio autor (2026).

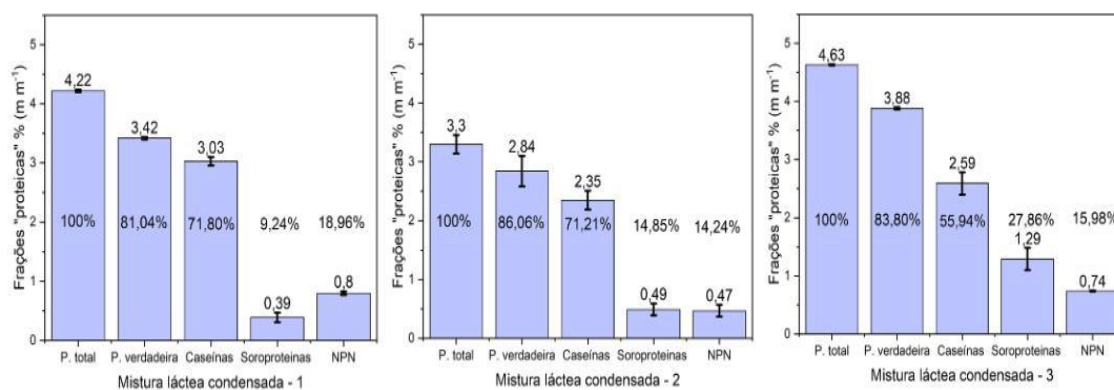
As amostras de doce de leite tradicional analisadas tiveram suas frações de proteína total (PT) e proteína verdadeira (PV) comparáveis aos valores encontrados nos rótulos dos produtos. A fração “proteica” não nitrogenada (NPN) das amostras variaram de 7,5% - 8,4% do valor de PT de referência (100%), um pouco mais alto se comparado

ao conteúdo encontrado em leite e derivados (Hotoon, 2015). Os valores encontrados na fração de “proteínas do soro”, variaram de $0,31\% \text{ m m}^{-1}$ - $0,39\% \text{ m m}^{-1}$, correspondendo entre 3,9% - 4,3% da PT, mas vimos na sessão anterior que essa fração possui complexos de caseína, logo torna-se errôneo tratar pela nomenclatura somente como proteínas do soro. E, conseqüentemente, a fração descrita como caseínas terá seu valor subestimado, esse variando nesse tipo de amostra numa faixa compreendida entre 86,8% a 88,4% da PT.

O elevado teor de NPN observado nas amostras de doce leite tradicional, em comparação ao leite condensado integral, pode ser atribuído às condições mais severas de processamento térmico. Estudos científicos mostram que, durante a fabricação do doce de leite, o aquecimento prolongado e, a presença de açúcares e bicarbonato, em conjunto favorecem a ocorrência da reação de *Maillard* e a formação de inúmeros compostos, como por exemplo o 5-hidroximetilfurfural (HMF) e as melanoidinas, que são produtos de degradação de proteínas e aminoácidos, e indicam alterações proteicas. Esses processos podem ter correlações com o aumento do teor de NPN em produtos lácteos concentrados, como o doce de leite tradicional (Francisquini *et al.*, 2017).

No caso das amostras de mistura láctea condensada, não há uma composição definida quanto aos ingredientes, podendo variar entre soro de leite e/ou soro de leite em pó reconstituído, permeado de soro de leite e/ou permeado de soro do leite reconstituído, leite desnatado e/ou leite desnatado em pó reconstituído, leite integral e/ou leite integral em pó reconstituído, açúcar, amido modificado, gordura vegetal e lactose. Para a caracterização das frações proteicas foram realizados os preparos de amostra definidos na sessão 4.1 e os cálculos indiretos, definidos na sessão 3.4.1.1, os quais possibilitaram a construção dos gráficos apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Frações proteicas das amostras comerciais (3) de mistura láctea condensada em $\% \text{ m m}^{-1}$.



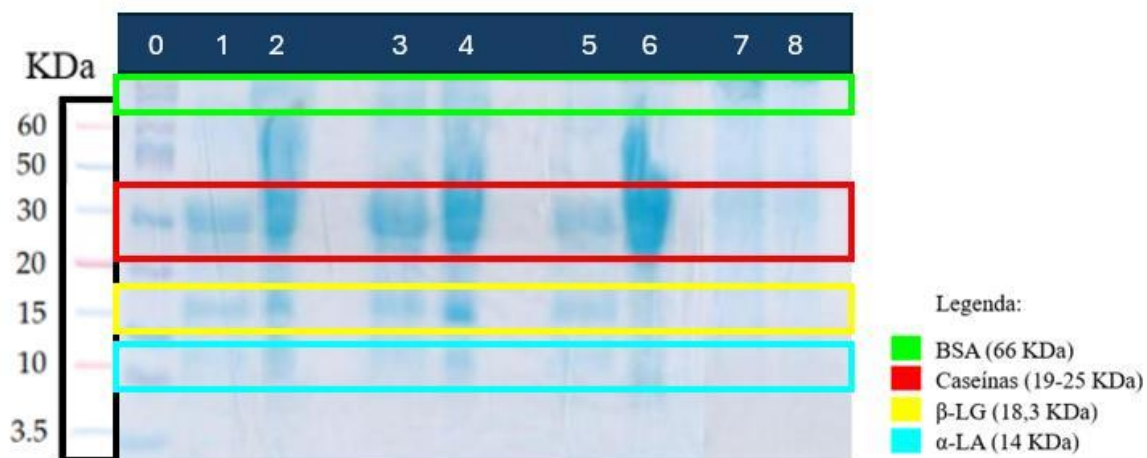
Proteína total: obtida através da fração nitrogenada total; **proteína verdadeira:** obtida pela diferença entre a fração nitrogenada total com a fração nitrogenada não proteica; **caseínas:** obtida pela diferença entre a fração nitrogenada total com a fração nitrogenada não caseínica; **soroproteínas:** obtida pela diferença da fração nitrogenada não caseínica com a fração nitrogenada não proteica; **NPN:** fração “proteica” não nitrogenada. Fonte: Próprio autor (2026).

A variabilidade na composição das misturas lácteas exerce influência direta sobre o perfil proteico do produto final. A substituição parcial do leite por soro de leite promove a redução do teor de caseínas, enquanto a utilização de permeado de soro de leite, caracterizado por conteúdo proteico residual, contribui para a diminuição das proteínas do soro e para o aumento relativo da fração de nitrogênio não proteico. Conseqüentemente, essas formulações podem resultar em produtos com menor valor nutricional proteico e maior proporção de compostos nitrogenados de baixo peso molecular, o que se reflete nos resultados obtidos a partir do fracionamento proteico das amostras analisadas.

Duas das três amostras de misturas lácteas condensada analisadas tiveram suas frações de proteína total (PT) e proteína verdadeira (PV) mais altas se comparados com os valores encontrados nos rótulos, como visto na Figura 14. A fração “proteica” não nitrogenada (NPN) das amostras variaram de 14% - 18,9% do valor de PT de referência (100%), um pouco mais alto se comparado ao conteúdo encontrado em leites (Hotoon, 2015). Os valores encontrados da fração de “proteínas do soro”, variaram de 0,39% $m\ m^{-1}$ - 1,29% $m\ m^{-1}$, correspondendo entre 9,2% - 28% da PT. Como não avaliamos o perfil proteico dessa amostra, não foi possível concluir que a fração de proteínas do soro corresponde exatamente esse conjunto de proteínas. A fração descrita inicialmente como caseínas varia nesse tipo de amostra numa faixa entre 56% a 71,8% da PT.

Para a obtenção do perfil eletroforético das amostras de leite condensado integral, doce de leite tradicional e mistura láctea, foram utilizados os preparos de amostra já descritos anteriormente na sessão 4.1 e, para as amostras lácteas condensada, seguiu-se as mesmas concentrações descritas para as amostras de leite condensado integral. As condições eletroforéticas foram as mesmas descritas na sessão 3.4.1.2, com exceção da voltagem aplicada, esta ajustada para 80 V. Nessa parte do trabalho, foram analisadas duas frações distintas para cada uma das amostras: (1) as proteínas totais e, (2) o precipitado obtido durante o preparo das amostras pelo método de NCN da AOAC (AOAC, 2012b). Na Figura 15, temos o perfil obtido por SDS-PAGE das amostras avaliadas.

Figura 15 - Perfil proteico por SDS-PAGE das frações de PT e do precipitado da fração de P(NCN)-AOAC das amostras de leite condensado, doce de leite e mistura láctea condensada.



0: padrão de proteínas recombinantes *Novex Sharp*; **1:** fração proteica total (PT) do leite UHT; **2:** fração do precipitado obtido a partir da partição da P(NCN)-AOAC do leite UHT; **3:** fração proteica total (PT) do leite condensado integral; **4:** fração do precipitado obtido a partir da partição da P(NCN)-AOAC do leite condensado integral; **5:** fração proteica total (PT) da mistura láctea condensada; **6:** fração do precipitado obtido a partir da partição da P(NCN)-AOAC da mistura láctea condensada; **7:** fração proteica total (PT) do doce de leite tradicional; **8:** fração do precipitado obtido a partir da partição da P(NCN)-AOAC do doce de leite tradicional.

Fonte: Próprio autor (2026).

A partir do perfil eletroforético, observa-se se que as frações proteicas totais, essas definidas pelos poços de números 1, 3, 5 e 7, possuem as frações das proteínas do soro bem como as frações pertencentes ao grupo das caseínas, mas, é possível observar que a intensidade das bandas está relacionada com a disponibilidade das proteínas nas matrizes analisadas, bem como as concentrações proteicas. Vimos que os poços de números 5 e 7, referentes a proteína total da mistura láctea condensada e do doce de leite tradicional, respectivamente, são os que possuem intensidade baixa das proteínas.

Avaliando os poços de número 2, este referente ao precipitado obtido a partir do fracionamento realizado a fim de obter a fração de NCN-AOAC, vimos que o processamento térmico UHT que a amostra de leite é submetida faz com que proteínas do soro do leite se complexem com as caseínas, tornando a quantificação dessas frações mais dificultosa. Nos poços de números 4, 6 e 8 podemos observar o mesmo comportamento, em diferentes matrizes lácteas que sofreram algum processamento térmico. Conclui-se que a metodologia descrita para a obtenção da fração nitrogenada não caseínica obtida pelo método da AOAC não se aplica de forma segura para amostras lácteas que foram submetidas a algum tratamento térmico. Logo, para contornar essa separação errônea, se

faz necessário a modificação dos grupos majoritários de proteínas avaliados, como as proteínas do soro e as caseínas.

Além disso, o método de separação baseado na precipitação em pH 4,6 (AOAC, 2012b), quando aplicado a matrizes submetidas a diferentes intensidades de tratamento térmico, não atua como um procedimento de fracionamento proteico clássico, mas permite traçar o perfil proteico característico de cada amostra em função de seu histórico térmico. Assim, a coprecipitação de proteínas do soro desnaturadas com as caseínas reflete o grau de processamento térmico ao qual o produto foi submetido, influenciando diretamente os resultados obtidos no fracionamento proteico (AOAC, 2012b).

4.4 PRODUÇÃO DE LÁCTEOS CONCENTRADOS

Na parte 4 desse trabalho, tivemos a produção de uma amostra de leite condensado e de uma amostra de doce de leite, ambos obtidos a partir de leite comercial UHT. A finalidade dessa avaliação seria a comparação das frações proteicas das amostras produzidas com as amostras comerciais, descritas na parte 3. A primeira avaliação das amostras produzidas foram os parâmetros físico-químicos, e o valores obtidos estão expostos na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros de composição físico-química das amostras de leite UHT comercial, doce de leite e leite condensado produzidos no laboratório (valores expressos em % m m⁻¹, exceto os sólidos solúveis em ° Brix).

Amostra	Marca	Extrato seco total	Sólidos solúveis	Resíduo mineral fixo	Gordura
Leite UHT	1	12,42 ± 0,04	12,87 ± 0,45	0,76 ± 0,03	3,70 ± 0,14
Leite condensado	4	75,72 ± 0,30	71,47 ± 0,06	1,98 ± 0,01	9,49 ± 0,43
Doce de leite	4	70,26 ± 0,45	71,57 ± 0,12	1,66 ± 0,01	6,81 ± 0,84

Valores expressos em média ± desvio padrão amostral.

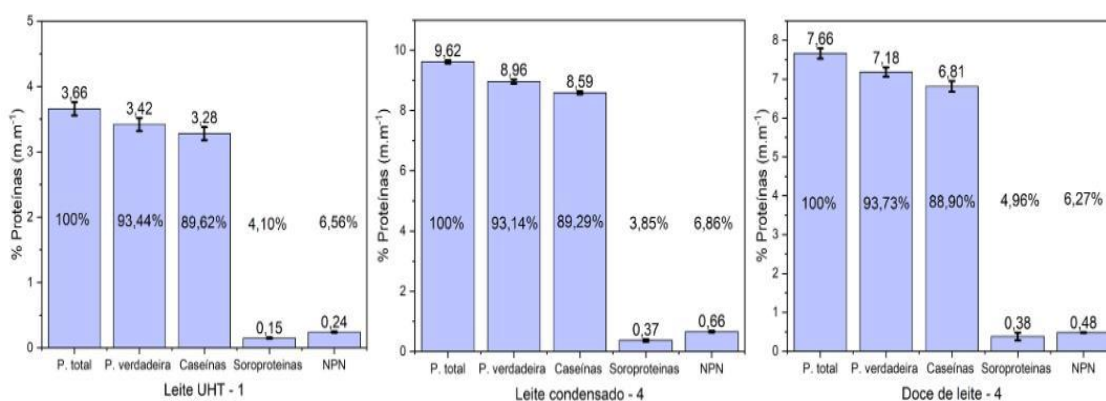
Fonte: Próprio autor (2026).

Na comparação dos valores encontrados para o leite UHT com a legislação, vimos que o teor de gordura (3,70 % m m⁻¹), o extrato seco desengordurado (extrato seco total menos a gordura), (8,72% m m⁻¹) se enquadram nos valores mínimos de 3,0 % m m⁻¹ de gordura e de 8,2% m m⁻¹ estabelecidos pelo MAPA para leite UHT integral (Brasil, 2025). Pela Instrução normativa que rege o leite condensado, vimos que o produto produzido (LC4) foi classificado como leite condensado integral, tendo o teor de gordura superior a 8% m m⁻¹ (9,49% m m⁻¹) (Brasil, 2018b). No caso do doce de leite (DL4), pelo

regulamento técnico, temos que a gordura deve ser superior a $6\% \text{ m m}^{-1}$ ($6,81\% \text{ m m}^{-1}$), teor de cinzas inferior a $2\% \text{ m m}^{-1}$ ($1,66\% \text{ m m}^{-1}$), teor de umidade menor do que $30\% \text{ m m}^{-1}$ ($29,74\% \text{ m m}^{-1}$) (Brasil, 1997).

As frações proteicas dos produtos avaliados como o leite UHT comercial, do leite condensado integral e do doce de leite tradicional foram avaliados e os valores expostos na Figura 16.

Figura 16 - Frações proteicas das amostras de leite UHT comercial, de leite condensado e doce de leite produzidos no laboratório em $\% \text{ m m}^{-1}$.



Proteína total: obtida através da fração nitrogenada total; **proteína verdadeira:** obtida pela diferença entre a fração nitrogenada total com a fração nitrogenada não proteica; **caseínas:** obtida pela diferença entre a fração nitrogenada total com a fração nitrogenada não caseínica; **soroproteínas:** obtida pela diferença da fração nitrogenada não caseínica com a fração nitrogenada não proteica; **NPN:** fração “proteica” não nitrogenada. Fonte: Próprio autor (2026).

Vimos que o leite cru apresenta $3,66\% \text{ m m}^{-1}$ de proteína total (PT) e, a partir do perfil proteico do leite UHT obtido na parte 3, vimos que os teores de proteínas do soro e de caseínas não são frações ditas puras, logo, o processamento térmico afeta a separação desses dois grandes grupos de proteínas, podendo esse parâmetro ser avaliado pela diminuição drástica das proteínas do soro do leite cru, de aproximadamente 20% da PT, e do leite UHT, esse valor diminui para 4% da PT. Nas matrizes lácteas produzidas, vimos que o comportamento das frações de “proteínas do soro” e de “caseínas” seguem a mesma faixa encontrada nos respectivos produtos comerciais, sendo pequenas diferenças relacionadas principalmente com os ingredientes dos referidos produtos.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo investigar as diferenças entre as frações proteicas presentes no leite cru, leite condensado, doce de leite e mistura láctea condensada, com foco nas alterações estruturais e quantitativas decorrentes dos processos de industrialização. Considerando que os produtos derivados são submetidos a tratamentos térmicos intensos, associados à concentração e à adição de açúcares, torna-se relevante compreender de que maneira essas etapas afetam a composição e o perfil das proteínas, em especial das caseínas e das proteínas do soro.

Para atingir esse objetivo, foram desenvolvidos e adaptados métodos analíticos específicos, adequados à natureza e à complexidade das matrizes alimentares analisadas. As amostras de leite condensado e doce de leite demandaram modificações no preparo, uma vez que os métodos convencionalmente aplicados ao leite cru não se mostraram plenamente eficazes, principalmente em função do elevado teor de sólidos, da alta viscosidade e da presença de interferentes, que dificultam a extração e a separação das frações proteicas.

A partir das adaptações implementadas, foi possível obter dados iniciais relevantes sobre o comportamento das proteínas após o processamento, evidenciando, por exemplo, a formação de complexos entre proteínas do soro e caseínas. Entretanto, verificou-se a necessidade de aprimoramentos metodológicos, sobretudo na etapa de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A baixa definição de algumas bandas proteicas e a dificuldade de correlação direta com os valores obtidos por métodos químicos, como o de Kjeldahl, reforçam a importância de ajustes adicionais.

Nesse sentido, a padronização de variáveis como a composição e concentração dos tampões, o tempo e a voltagem da corrida eletroforética, bem como a utilização de marcadores de massa molecular adequados, tende a contribuir significativamente para a obtenção de perfis mais definidos e informativos. Esses avanços são fundamentais para uma caracterização mais precisa das proteínas envolvidas, permitindo um entendimento mais aprofundado dos efeitos do processamento térmico e tecnológico sobre a qualidade nutricional e funcional dos produtos lácteos estudados.

REFERÊNCIAS

- ANEMA, S. G.; LI, Y. Effect of pH on the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 6, p. 1640–1646, 2003.
- AOAC. Official method 998.05: Noncasein nitrogen content of milk. In: **AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International**. 19. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2012.
- AOAC. Official method 991.21: Nonprotein nitrogen in whole milk. In: **AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International**. 19. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2012.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 21. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2019.
- AOAC. Official method 932.12: Soluble solids by refractometry. In: **AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International**. 21. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2019.
- AOAC. Official method 2000.18: Fat in milk – Gerber method. In: **AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International**. 21. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2019.
- AOAC. Official method 989.05: Fat in milk – Modified Mojonnier ether extraction method. In: **AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International**. 21. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2019.
- ASCHAFFENBURG, R.; DREWRY, J. New procedure for the routine determination of the various non-casein proteins of milk. In: **international Dairy Congress**, 15., 1959, London. Proceedings of the 15th International Dairy Congress. London: International Dairy Federation, 1959.
- BIO-RAD LABORATORIES. A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection. **Hercules: Bio-Rad Laboratories**, 2012.
- BLANCO, A. **Química Biológica**. 8. ed. Buenos Aires: El Ateneo, 2006.
- BOBE, G.; BEITZ, D. C.; FREEMAN, A. E.; LINDBERG, G. L. Separation and Quantification of Bovine Milk Proteins by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 2, p. 458–463, 1998.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Portaria nº 783, de 4 de abril de 2025**. Incorpora a Resolução MERCOSUL/GMC/RES nº 13/23, que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UAT (UHT). Brasília, 2025.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 354, de 4 de setembro de 1997**. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Doce de Leite. Brasília, 1997.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002**. Dispõe sobre a rotulagem de alimentos embalados. Brasília, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003**. Dispõe sobre a rotulagem nutricional de alimentos embalados. Brasília, 2003.

BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamenta a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018**. Dispõe sobre os regulamentos técnicos de identidade e qualidade do leite cru refrigerado, do leite pasteurizado e do leite pasteurizado tipo A. Brasília, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 47, de 26 de outubro de 2018**. Dispõe sobre os procedimentos de registro, fiscalização e controle de estabelecimentos e produtos de origem animal. Brasília, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006**. Aprova os métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Brasília, 2006.

BUXBAUM, E. **Fundamentals of Protein Structure and Function**. 2. ed. Cham: Springer, 2015.

CARNEIRO, L. C. M.; PINTO, C. B. dos A.; GOMES, E. R.; PAULA, I. L. de; POMBO, A. F. W.; STEPHANI, R.; CARVALHO, A. F.; PERRONE, I. A química e a tecnologia do doce de leite: uma revisão. *Research, Society and Development*, [s. l.], v. 10, n. 11, e155101119408, 2021.

CHEN, C. C.; CHEN, S. T.; HSIEH, J. F. Proteomic analysis of polysaccharide-milk protein interactions induced by chitosan. *Molecules*, Basel, v. 20, n. 5, p. 7737–7749, 2015.

CORREDIG, M.; DALGLEISH, D. G. Effect of heating of cream on the properties of milk fat globule membrane isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 46, n. 7, p. 2533–2540, 1998.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DEPETERS, E. J.; CANT, J. P. Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 75, n. 12, p. 3192–3209, 1992.

DI MARZO, L.; PRANATA, J.; BARBANO, D. M. Measurement of casein in milk by Kjeldahl and sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 104, n. 7, p. 7448–7456, 2021.

FABRIS, L. V.; SANTOS, L. M. dos; STEFANI, G. P. Análise comparativa do conteúdo de proteínas e rótulo nutricional de suplementos de whey protein, proteínas vegetais e animais. *Revista Contexto & Saúde*, Ijuí, v. 24, n. 48, e14497, 2024.

FOX, P. F.; UNIACKE-LOWE, T.; McSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 2. ed. Cham: Springer, 2015.

FRANCISQUINI, J. D.; MARTINS, E.; SILVA, P. H. F.; SCHUCK, P.; PERRONE, Í. T.; CARVALHO, A. F. Reação de Maillard: uma revisão. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 72, n. 1, p. 48–56, 2017.

GAZE, L. V.; COSTA, M. P.; MONTEIRO, M. L. G.; LAVORATO, J. A. A.; CONTE JÚNIOR, C. A.; RAICES, R. S. L.; CRUZ, A. G.; FREITAS, M. Q. Dulce de leite, a typical product of Latin America: characterisation by physicochemical, optical and instrumental methods. **Food Chemistry**, Oxford, v. 169, n. 1, p. 471–477, 2015.

GOLDRING, J. P. D. The roles of acetic acid and methanol during fixing and staining proteins in an SDS–polyacrylamide electrophoresis gel. **Methods in Molecular Biology**, v. 1853, p. 15–18, 2018.

GONZÁLEZ, A.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. Nitrogen fractions and non-protein nitrogen components in milk. **Lait**, Paris, v. 81, n. 4, p. 403–415, 2001.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C. de; PAULA, H. de. Whey protein: composition, nutritional properties, applications in sports and benefits for human health. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 4, p. 479–488, 2006.

HARTL, M.; BISTER, K. Analyzing Myc in cell transformation and evolution. In: VOGT, P. K. (ed.). **Methods in Molecular Biology**. v. 1012. New York: Humana Press, p. 21–49, 2013.

HE, F. Laemmli SDS-PAGE. **Bio-protocol**, v. 1, n. 1, e80, 2011. Disponível em: <https://bio-protocol.org/e80>. Acesso em: 22 fev. 2026.

HOOTON, L. C. S. **Caracterização do conteúdo em NPN (azoto não-proteico) no leite e estudo do seu impacto nos rendimentos de transformação de leite em queijo**. 2015. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biológica, ramo de Tecnologia Química e Alimentar) – Universidade do Minho, Braga, 2015.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION;
INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk and milk products — **Determination of nitrogen content — Part 1: Kjeldahl principle**. ISO 8968-1 | IDF 20-1. Geneva: ISO; Brussels: IDF, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 5725-1:1994: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions**. Geneva, 1994.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 5725-2:1994: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method**. Geneva, 1994.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION;
INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **ISO 6731 | IDF 21: Milk, cream and evaporated milk — Determination of total solids content (Reference method)**. Geneva, 2010.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION;
INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **ISO 1740 | IDF 25: Milk and milk products — Determination of ash content**. Geneva; Brussels, 2008.

JAVED, H.; ARSHAD, S.; ARIF, A.; SHAHEEN, F.; SEEMAB, Z.; RASOOL, S.; RAMZAN, H. S.; ARSALAN, H. M.; AHMED, S.; WATTO, J. I. Comparison of extraction methods and nutritional benefits of proteins of milk and dairy products: a review. **Czech Journal of Food Sciences**, Prague, v. 40, n. 5, p. 331–344, 2022.

- KIĘLCZEWSKA, K.; KOWALIK, J.; DĄBROWSKA, A.; JANKOWSKA, A.; WACHOWSKA, M. The effect of high-pressure treatment and skimming on caprine milk proteins. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 13, 6025, 2021.
- KJELDAHL, J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, Berlin, v. 22, p. 366–382, 1883.
- KOWACZ, M.; MUKHOPADHYAY, A.; CARVALHO, A. L.; ESPERANÇA, J. M. S. S.; ROMÃO, M. J.; REBELO, L. P. N. Hofmeister effects of ionic liquids in protein crystallization: Direct and water-mediated interactions. **CrystEngComm**, v. 14, n. 15, p. 4912–4921, 2012.
- KURIEN, B. T.; DANDA, D.; BACHMANN, M. P.; HAL SCOFIELD, R. SDS-PAGE to immunoblot in one hour. In: KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. (eds.). **Western Blotting: Methods and Protocols**. New York: Humana Press, p. 449–454, 2015.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LAI, E. P. C.; TSOPMO, A. **Casein chemistry: structure, functions, and applications**. 1. ed. London: Emerald Publishing, 2025.
- LARSON, B. L.; ROLLERI, G. D. Heat denaturation of the specific serum proteins in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 38, n. 4, p. 351–360, 1955.
- LEE, Y. R.; HONG, Y. H. Electrophoretic behaviors of α -lactalbumin and β -lactoglobulin mixtures caused by heat treatment. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 16, n. 7, p. 1041–1045, 2003.
- LUTZ, I. A. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- MARIA, A.; MARTINS, A.; BOAS, L. V.; SILVA GADELHA, S. C. F.; SILVA, M. A. P.; CRUZ, A. G.; MOURA, R. S.; CAPPATO, L. P. Leite condensado: inovação na conservação e diversificação para atender às demandas do mercado. **Revista Técnica da Agroindústria**, v. 1, n. 1, p. 1–3, 2024.
- MARTINS, S. I. F. S.; JONGEN, W. M. F.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 11, n. 9–10, p. 364–373, 2000.
- MENDES, P. N. **Avaliação do processo de produção de leite condensado com pré-concentração por membranas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.
- NAYIK, G. A.; GULL, A.; MASOODI, L.; NAVAF, M.; SUNOOJ, K. V.; UCAK, İ.; AFREEN, M.; KAUR, P.; REHAL, J.; JAGDALE, Y. D.; RAMNIWAS, S.; SINGH, R.; MUGABI, R. Milk proteins: chemistry, functionality and diverse industrial applications. **Cogent Food & Agriculture**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2272203, 2024.
- NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E. Total nitrogen analysis: method of Kjeldahl. In: PAGE, A. L. (ed.). **Methods of Soil Analysis: Part 2. Chemical and Microbiological Properties**. Madison: American Society of Agronomy, p. 595–624, 1982.

OLIVEIRA, K. M. G.; VALENTE-MESQUITA, V. L.; BOTELHO, M. M.; SAWYER, L.; FERREIRA, S. T.; POLIKARPOV, I. Crystal structures of bovine β -lactoglobulin in the orthorhombic space group C2221. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 2, p. 477–484, 2001.

ORIENTE, S. F.; SILVA, P. I. S.; RAMOS, N. J. S.; SANTOS, R. M. S.; GUSMÃO, T. A. S.; GUSMÃO, R. P.; PASQUALI, M. A. B. Estratégia, conceito e produtividade de leite e queijo caprino: uma revisão bibliográfica. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 11, e116121143838, 2023.

ORIGINLAB CORPORATION. **OriginLab: data analysis and graphing software**. Northampton: OriginLab Corporation, 2025.

PADILLA DOVAL, J.; ZAMBRANO ARTEAGA, J. C. Estructura, propiedades y genética de las caseínas de la leche: una revisión. **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 16, n. 3, p. 62–95, 2021.

PEARSON, G. S. **The democratization of food: tin cans and the growth of the American food processing industry, 1810–1940**. 2016. Tese (Doutorado em História) – Lehigh University, Bethlehem, 2016.

ROWLAND, S. J. The determination of the nitrogen distribution in milk. **Journal of Dairy Research**, v. 9, n. 1, p. 42–46, 1938.

SILVA, D. J. da. **Análise de alimentos: métodos químicos e bromatológicos**. Viçosa: UFV, 2002.

SILVA, N. N.; CASANOVA, F.; PINTO, M. da S.; CARVALHO, A. F. de; GAUCHERON, F. Casein micelles: from the monomers to the supramolecular structure. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, e2018070, 2019.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M. **Fundamentals of analytical chemistry**. 9. ed. Belmont: Brooks/Cole, 2014.

STEPHANI, R.; FRANCISQUINI, J.; PERRONE, Í. T.; CARVALHO, A. F. de; OLIVEIRA, L. F. C. de. Milk production, processing and marketing. In: STEPHANI, R.; FRANCISQUINI, J.; PERRONE, Í. T.; CARVALHO, A. F. de; OLIVEIRA, L. F. C. de (org.). **Milk production, processing and marketing**. London: IntechOpen, 2019.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

WINGFIELD, P. Protein precipitation using ammonium sulfate. **Current Protocols in Protein Science**, New York, v. 13, n. 1, 1998.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Nota sobre o método semi-micro Kjeldahl. **Revista de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, p. 39–40, 1980.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; FERNANDES, R. M.; GRANZINOLLI, G. G. M. Efeitos da pasteurização HTST e da fervura doméstica sobre a proteína do leite. **Revista de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 37, p. 3–7, 1982.

WUSIGALE; LIANG, L.; LUO, Y. Casein and pectin: structures, interactions, and applications. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 97, p. 391–403, 2020.

WWPDB CONSORTIUM. **High-resolution crystal structure of bovine beta-lactoglobulin** (PDB ID: 1QG5). 2001. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1QG5>. Acesso em: 25 jan. 2026.

YADAV, P.; KUMAR, S.; TANPURE, M. U.; GUPTA, V. P.; KUMAR, V.; BOCHALYA, R. S.; SINGH, G.; BACHAN, S. Advancements in dairy technology: innovations and trends in milk processing. **International Journal of Agriculture Extension and Social Development**, v. 8, n. 4S, p. 35–45, 2025.