

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

ELABORAÇÃO E PROCESSAMENTO DE PROTEÍÍ
NA DE SÔRO DE QUEIJO FORTIFICADO
COM Fe.

Carlos Campillo Sanabria

Orientador:

Prof.Dr. Rodolfo D.Reyna B.

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrí-
cola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do
Título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

- Fevereiro de 1978 -

COPIA
N.º 1000

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. RODOLFO D. REYNA B. pelo apoio, a orientação segura e efetiva, e sobretudo pela amizade.

Ao Prof. Dr. ANDRÉ TOSELLO, Diretor da FEA/UNICAMP pelas facilidades oferecidas para a realização dos cursos de pós graduação.

A Universidade Autónoma de Querétaro, pela oportunidade brindada para estudar o mestrado, mediante o "Programa de Formación - de Profesores".

A ANUIES do México pelo apoio econômico concedido ao autor, contribuindo a que este trabalho chegasse a seu término.

Ao M.R.E. do Governo do Brasil pelas facilidades oferecidas para estudar nesta Universidade, mediante o Convênio Cultural Brasil-México.

Ao Departamento de Nutrição, principalmente ao Prof. Dr. VALDEMIRO CARLOS SGARBIERI e ao M.S. PEDRO LUIZ ANTUNES pela orientação na parte de ensaios biológicos deste trabalho.

Ao Prof. Dr. FREDERICK CARL STRONG III pelas facilidades oferecidas no laboratório de Análise Instrumental e na elaboração do Summary.

Ao pessoal do laboratório de Tecnologia de Alimentos, especialmente a ANA L. NEVES G. pela sua amizade e ajuda na elaboração da tese.

A meus colegas e amigos pelo apoio moral, com especial atenção as famílias Fuentes-Gonzales e Fuentes-Chamorro.

ÍNDICE

página

ÍNDICE DE QUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMO	v
SUMMARY	vii
INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
Definição	4
Importância	4
Produção	5
Valor Nutritivo	10
Recuperação das Proteínas do Sêro	14
Fortificação do Sêro	16
Usos	21
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1. MÉTODOS QUÍMICOS	26
Nitrogênio	26
Nitrogênio Total sem Caseína	26
Nitrogênio não Proteico	26
Nitrogênio Solúvel	26
Umidade	27
Cinzas	27
Determinação de Ferro	27
Hemoglobina	29
2.2. MÉTODOS BIOLÓGICOS	29
Quociente de Eficiência Proteica	30

	página
Disponibilidade de Ferro	34
2.3. ELABORAÇÃO DO PUDIM	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1. PADRONIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE PRECIPITAÇÃO DA PROTEÍNA	37
Influência da Temperatura	37
Efeito do Tempo	38
Efeito do pH	42
Adição de Ferro	46
Concentração do Soro	48
3.2. ENSAIOS QUÍMICOS	48
Proteína Solúvel	48
Umidade	50
Proteína Recuperada no Produto	50
3.3. ENSAIOS BIOLÓGICOS	51
Quociente de Eficiência Proteica	51
Disponibilidade de Ferro	51
3.4. ELABORAÇÃO DO PUDIM	53
4. CONCLUSÕES	57
5. LITERATURA CITADA	59

ÍNDICE DE QUADROS

	página
QUADRO I. PRODUÇÃO DE LACTOSORO EM VÁRIOS PAÍSES	8
QUADRO II. COMPOSIÇÃO DO SÔRO FRESCO	11
QUADRO III. FLUXOGRAMA DO PROCESSO SEGUIDO	25
QUADRO IV. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA DIETA PARA DETERMINAR PER	31
QUADRO V. COMPOSIÇÃO DA MISTURA VITAMÍNICA USADA PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS	32
QUADRO VI. COMPOSIÇÃO DA MISTURA SALINA USADA PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS	33
QUADRO VII. COMPOSIÇÃO PORCENTUAL DA DIETA CARENTE DE Fe	34
QUADRO VIII. FÓRMULA PARA A ELABORAÇÃO DO PUDIM	35
QUADRO IX. RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA A DIFERENTES TEMPERATURAS	38
QUADRO X. RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA A DIFERENTES TEMPOS DE AQUECIMENTO	40
QUADRO XI. RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA A DIFERENTES pH E SEU CONTEÚDO DE CINZAS	42
QUADRO XII. ADIÇÃO DE FeCl_3 AO SÔRO E CONCENTRAÇÃO DE Fe NA PROTEÍNA OBTIDA	47
QUADRO XIII. DETERMINAÇÕES FEITAS NO SÔRO PRODUZIDO NA ELABORAÇÃO DE QUEIJO DA MASSA SEMI-COZIDA E NA PROTEÍNA OBTIDA	49

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
FIGURA 1. PRODUÇÃO DE LACTOSORO NO BRASIL 1970-1977	7
FIGURA 2. RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA A DIFE- RENTES TEMPERATURAS	39
FIGURA 3. RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA A DIFE- RENTES TEMPOS DE AQUECIMENTO	41
FIGURA 4. RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA A DIVER- SOS pH	44
FIGURA 5. CONTEÚDO DE CINZAS A DIFERENTES pH	45
FIGURA 6. AUMENTO DE PÊSO DOS RATOS ALIMENTA- DOS COM A PROTEÍNA DE SÔRO DE QUEIJO	52
FIGURA 7. NÍVEL DE Hb DOS RATOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES PORCENTAGENS DE Fe	54

RESUMO

Fizeram-se experiências a nível de laboratório para determinar as condições ótimas de temperatura, tempo e pH de precipitação da proteína do lactosoro, encontrando-se os valores de 92°C , 20 min e pH 4,5, respectivamente. Dentro da precipitação da proteína, com o objetivo de fortificá-la com Fe, fizeram-se ensaios de adição de diferentes quantidades de solução de FeCl_3 a 30% ao sôro, de maneira a obter um produto com 0,11-0,14% de Fe.

Com os parâmetros de precipitação, e a quantidade de solução de FeCl_3 a 30% definidos, realizaram-se um total de 20 experiências a nível piloto de 100 g cada, obtendo-se aproximadamente 10 kg - de produto com 56.89% de proteína.

Para estudar a influência da concentração do sôro (15-18% S.T.) na recuperação da proteína, foram feitas experiências a nível de laboratório (Rotavapor RE Büchi), e a nível piloto (evaporador centrífugo Centriterm CT 1B-2). Problemas técnicos impediram de continuar com este estudo, embora ao comprovar que a recuperação da proteína usando sôro concentrado, era só 15% a mais que o sôro sem concentrar, tenha-se decidido trabalhar com este último - tipo de sôro devido a sua vantagem do ponto de vista econômico.

Para conhecer a disponibilidade da proteína e de Fe, foram feitos ensaios biológicos com ratos para definir o valor PER e a disponibilidade de Fe do produto obtido, encontrando-se o valor PER de 2,91 usando como referência o valor 2,5 correspondente a caseína, e uma disponibilidade de Fe de 59,3% considerando o FeSO_4 com valor 100%.

Elaborou-se uma sobremesa tipo "pudim" a base de proteína de sôro fortificada com Fe; na fórmula do "pudim", o leite foi substituído totalmente por água para poder oferecer assim um produto nutritivo e econômico. O nível de Fe foi de 12-14 mg e 10% de proteína. O "pudim" foi submetido a degustadores e o resultado desta prova indicou boa aparência, e a proteína adicionada não contribuiu negativamente para o sabor, embora apresentasse gosto "aquoso" e "arenoso".

SUMMARY

In this work, laboratory experiments were done on the determination of optimum conditions of temperature, time and pH for whey protein precipitation. They were found to be 92°C, 20 min and pH 4.5, respectively. To fortify the protein with iron various amounts of FeCl₃ (30%) solution were added, to the whey during the precipitation process, in such a way as obtain a product with 0.11 to 0.14%Fe.

With precipitation parameters and the amount of FeCl₃ solution determined, 20 experiments were made at pilot plant level, each one with 100 liters, resulting in approximately 10 kg of product with 56.9% protein.

To study the influence of whey concentration (15 to 18% S.T.) in protein recovery, experiments were made at "laboratory level" (Rotavapor RE Büchi) and at pilot plant level (Evaporator centrifuge - "Centriterm CT 1B-2). Technical problems prevented the continuation of this part of the work. However, it was found that the protein recovery, using concentrated whey, was only 15% more than that using non-concentrated whey, so it was decided to work with the latter, taking into account its low cost.

Biological tests with rats were made to determine the PER value and the availability of iron in the product obtained. The PER value was found to be 2.91, using casein at 2.5 as a reference. The availability of Fe was 59.3%, considering FeSO_4 as 100%.

A dessert type pudding was prepared from whey protein fortified with iron. In the pudding recipe, the milk was replaced with enough water to provide a nutritive and economical product. The level of iron was 12-14 and 10 g of protein per 100 grams. The pudding was then submitted to tasters. The result of the test indicated that the pudding had a good appearance, and that the protein did not contribute negatively to the flavour, but the product was considered to be watery and granular.

INTRODUÇÃO

A importância que tem adquirido o sêro de queijo (lactosoro) nos últimos anos, deve-se principalmente a dois fatos: seu alto valor nutritivo, e a poluição que pode causar quando presente - em rios e esgotos.

A alta qualidade das proteínas do lactosoro tem-se reconhecido há muito tempo. Devido a seu importante conteúdo de aminoácidos, principalmente sulfurados, situam-se entre as melhores proteínas, sô superadas pelas proteínas do ovo. Seu valor de PER - (Protein Efficiency Ratio; Quociente de Eficiência Proteica) é o mais alto, inclusive maior que a proteína padrão, a caseína.

A produção mundial de lactosoro tem-se incrementado ano após-ano, sô em 1973 a produção estimada foi de 74 milhões de toneladas representando um aumento de aproximadamente 25% a partir de 1966. Ainda nos países em vias de desenvolvimento como o Brasil, o incremento tem sido importante, sômente no período de 1971-77 calcula-se um aumento na produção de lactosoro de quase 50%.

Do lactosoro produzido, mais da metade não é utilizado, o que representa um desperdício importante de proteínas de alta quali

dade. Considerando a produção estimada no Brasil para 1977 de 933.600 t de lactosoro, poderiam-se recuperar um total de 2336,6 t de proteínas, as quais cobririam as necessidades diárias recomendadas pela FAO/OMS de 25 g de proteína/dia para crianças de 7-9 anos de idade, e serviriam para alimentar diariamente um total aproximado de 256.000 crianças.

O lactosoro que não é processado, na maior parte é lançado nos esgotos e água dos rios ocasionando um grande problema de poluição devido a seu alto DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) calculado em 30.000-50.000 mg/lítro. Considera-se que 50 kg de lactosoro possuem uma DBO semelhante a de 21 pessoas.

Em vários países com a necessidade de combater a poluição cada vez maior, além de recuperar a proteína de alta qualidade está se pesquisando novas técnicas de recuperação e métodos de utilização da proteína.

Com o objetivo de propor um método de utilização da proteína e de oferecer um produto de alto valor nutritivo, além de ser uma fonte rica de Ferro destinado a alimentação de crianças, em idade escolar, elaborou-se um "pudim" a base de proteína de lactosoro a qual tem sido fortificada com ferro ao precipitá-la por aquecimento com FeFC_3 em meio ácido.

O produto está destinado a cobrir dois grandes problemas a nível internacional, principalmente em crianças: a desnutrição, e a anemia devido a deficiência de ferro.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. DEFINIÇÃO

O sôro ou lactosoro, é o subproduto da precipitação da caseína. Quando se obtém, em particular, da transformação do leite em queijo, chama-se também sôro de queijo (7, 16, 25, 46). A composição do sôro varia dependendo do período de lactação, composição do leite, tipo de processo na fabricação do queijo, ou das técnicas usadas (16, 46, 53). Tem-se dois tipos de sôros produzidos na fabricação do queijo: doce e ácido. O sôro doce, é produzido quando se usa renina na fabricação do queijo. O sôro ácido compreende três grupos de sôros: sôro ácido (sôro de caseína), sôro de queijo Cottage ou Quarg e sôro doce ácido (aumento de acidez quando por fermentação natural produz ácido láctico) (44). A principal diferença entre sôro doce e ácido, é seu odor e pH. O sôro ácido geralmente tem seu pH 4,6-4,7 e possui um odor picante, enquanto o sôro doce tem seu pH de 5,0-7,0 e não tem odor (7).

2. IMPORTÂNCIA

A importância que tem adquirido o lactosoro nos últimos anos,

deve-se principalmente a dois fatos: a poluição que causa nas águas dos rios e esgotos, quando é lançado nelas, cada vez em maior quantidade devido ao aumento da produção de queijo nos últimos anos (7, 8, 15, 16, 19, 42, 45), e a seu alto valor nutritivo (2, 7, 8, 14, 19, 23, 31, 42, 45, 55).

2.1. Produção

A produção de lactosoro tem aumentado ano após ano devido ao crescimento da indústria queijeira. É difícil saber exatamente a quantidade de lactosoro produzido, já que nos diferentes países produtores com exceção de países como Holanda, Inglaterra e Dinamarca, geralmente não existem estatísticas relativas ao produto. As estimativas baseiam-se na produção de queijo e caseína (16). Sabe-se que por cada 10 kg de leite, aproximadamente se obtém 4-1 kg de queijo mais 6-9 kg de soro respectivamente (8,25).

Na atualidade o soro não é utilizado suficientemente, embora possua 6-7% de sólidos, cerca de 1/3 desses sólidos do leite, representando uma grande fonte de proteínas (42).

A produção mundial de soro durante 1966-1973 aumentou em quase 25% (Quadro I). Ainda nos países em desenvolvimento como o Brasil, a produção de lactosoro nos últimos anos tem aumentado.

Lemos (1977), indica que para 1977 a produção calculada para o Brasil será de 1.068.150 t de soro, o que representa um aumento de mais de 50% a partir de 1971 (33). De acordo com os dados dos últimos sete anos da FIBGE, a tendência na produção de lactosoro no Brasil para os próximos anos é de aumentar cada vez em maior produção, já como indica a Figura 1 (22).

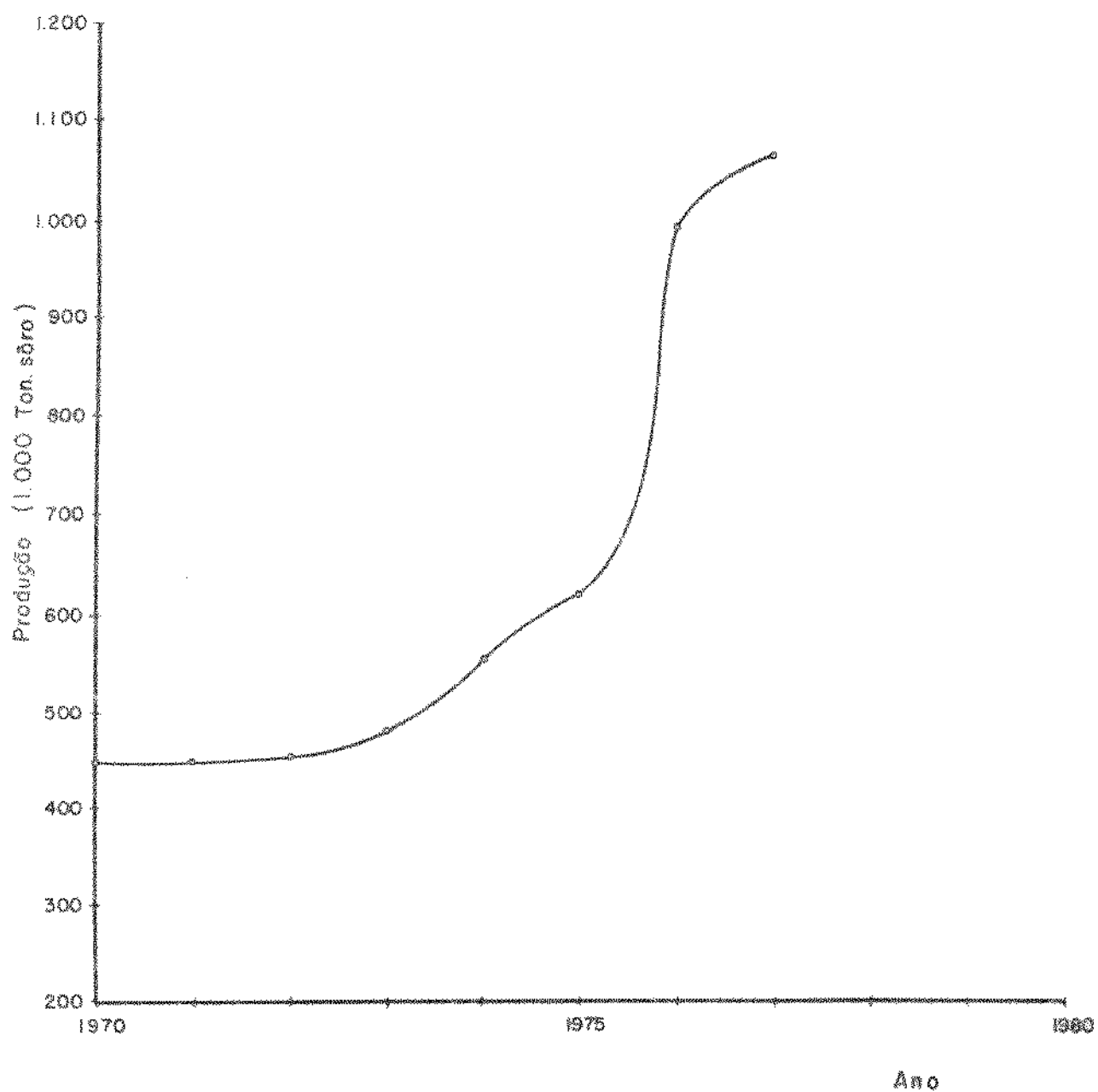


Figura 1. PRODUÇÃO DE LACTOSORO NO BRASIL 1970-1977.

QUADRO 1. PRODUÇÃO DE LACTOSORO EM VÁRIOS PAÍSES
(em 1.000 T)^a

ANO	PAÍSES DA COMUNI- DADE EUROPÉIA ^b	E.U.A ^b	BRASIL ^{c,d}	MUNDIAL ^b
1966	15.456	8.618	57	57.113
1970	-	-	456	-
1971	17.962	10.883	455	66.190
1972	18.989	11.804	457	68.948
1973	19.309	11.836	482	74.000
1974	-	-	560	-
1975	-	-	621	-
1976	-	-	997	-
1977	-	-	1.068	-

a. Base de estimação: 8kg sôro/kg queijo.

b. Anon. Milk Ind. 75(4), 23-25, 1974.

c. FIBGE, 1974.

d. Lemos J. Rev. do Inst. C.Tostes nº 189 (32), 3-18, 1977.

Nos países desenvolvidos, aproximadamente a metade do sôro pro-
duzido não é utilizado, o que representa um desperdício impor-
tante de proteínas, que poderiam ajudar a combater a desnutri-
ção (8). Somente no Brasil, considerando a produção estimada

para 1977 de 1.068.150 t de lactosoro, poderiam ser recuperadas um total de 2.670,375 t de proteínas (5g proteína/kg soro; considera-se um rendimento de 50%), as quais cobririam as necessidades diárias recomendadas pela FAO/OMS 1975 (21) para crianças de 7-9 anos de idade, de 25g de proteína por dia, e serviriam para alimentar um total diário aproximado de 292.600 crianças.

O soro que não é processado, em sua maioria é lançado nas águas dos rios e esgotos, ocasionando um sério problema de poluição, devido a seus nutrientes orgânicos (16). O valor da demanda Biológica de Oxigênio (DBO) do soro varia de 30.000-50.000 mg/l dependendo do tipo de soro (25, 42). Gillies (1974), considera que o DBO de 3.785 l (1.000 gal) de soro fresco descarregado - nas águas dos esgotos, é semelhante a DBO de 1.800 pessoas(25).

A necessidade de combater a poluição cada vez maior, e de recuperar a proteína de alta qualidade, tem levado os poderes públicos de vários países a tomar medidas cada vez mais severas - para evitar que o soro seja lançado nas águas dos rios e esgotos; inclusive em alguns países como E.U.A., essas agências pesquisam novas técnicas de recuperação e métodos de utilização da proteína (7).

2.2. Valor nutritivo

No sôro permanecem vitaminas hidrossolúveis, minerais, lactose, e proteínas de alta qualidade, o que fazem com que seja um produto muito nutritivo. As vitaminas que permanecem no sôro - são: vitamina B₁₂, tiamina, riboflavina, niacina, ácido panto-tenico, colina, ácido fôlico. A lactose é o componente mais abundante no sôro e desempenha um papel importante na assimilação de Ca e P pelo organismo. O sôro é também uma excelente fonte de minerais, tais como Ca, Mg, P, K (17). O Quadro II indica a composição do sôro fresco.

QUADRO II. COMPOSIÇÃO DO SÔRO FRESCO
(por 100 g sôro)^a

Água		93,1 g
α lactalbumina	50	
β lactoglobulina	22	0,9 g
Proteínas		
Immunoglobulinas	12	
Soroalbuminas	5	
Proteose-peptonas	10	
Gordura		0,3 g
Lactose		5,1 g
Cinzas		0,6 g
Ca		51,0 mg
P		53,0 mg
Fe (b)		0,01mg
Vitamina A		10,0 UI
Tiamina		0,03mg
Riboflavina		0,14mg
Niacina		0,10mg

a. Anon. Milk Ind. 75(4) 23-25, 1974.

b. Unnikrishnan V., Bhinasena. Milchwissenschaft 32(3) 132-135, 1977.

As principais proteínas do lactosoro são: α lactalbumina , β lactoglobulina, soroalbumina, immunoglobulina e proteose-peptone (Quadro II), existindo ainda, uma fração de proteínas menores e um complemento de enzimas (53, 54). As proteínas do sôro

precipitam facilmente por adição de ácido tricloroacético (TCA) a 12%, ácido tungstênico, ou sais minerais em concentração elevada. A diferença das caseínas, com relação as proteínas do lactosoro, é que estas permanecem em solução em seu ponto isoelétrico (pH 4,6) porém se insolubilizam ao desnaturar-se pelo calor a temperaturas próximas a 100°C, com exceção das proteose-peptonas (53). Sua concentração varia de 4,0-6,5 g/l dependendo do tipo de soro, período de lactação e condições de processamento na fabricação de queijo (46).

Estas proteínas formam uma fração muito complexa; são comparadas as proteínas do plasma sanguíneo, pois tem similaridade entre albuminas, proteose-peptonas e imunoglobulinas lácteas e as soroalbuminas, seromucóides e globulinas sanguíneas, respectivamente (2). Além disso uma parte das proteínas do lactosoro são derivadas diretamente do sangue, como é o caso das soroalbuminas, transferrina e imunoglobulinas que são excretadas nas glândulas mamárias sem modificação aparente. As imunoglobulinas entretanto são parcialmente sintetizadas na glândula mamária, junto as a lactalbuminas, lactoferrina e a maioria das enzimas presentes no leite (3).

Dentre as proteínas menores, as principais por seu conteúdo de Fe são: lactoferrina, transferrina e as proteínas com atividade

enzimática lactoperoxidase e xantina oxidase (3, 53).

A lactoferrina é uma metaloproteína que contém dois átomos de Fe por molécula (0,11% Fe) (53). É uma proteína importante devido a sua relação com o metabolismo de Fe, já que se tem comprovado que de todos os organismos bovinos envolvidos na absorção de Fe, o úbere é a que apresenta maior aptidão para fixar Fe; esta absorção pode ser devida a alta atividade quelante da lactoferrina. Acredita-se que quatro aminoácidos de lactoferrina desempenham um papel importante na fixação do Fe: Tirosina, Histidina, Treonina e Cistina. É também possível que a lactoferrina se associe às albuminas, semelhante ao que ocorre com a transferrina humana (3).

As proteínas do sêro tem sido reconhecidas desde tempos por ser nutricionalmente superior a maioria das outras proteínas. Já em 1924, definiu-se sua capacidade de satisfazer as necessidades proteicas em ratos (38). É bem conhecido que o valor das proteínas do sêro, é mais alto que o da caseína. Tem sido demonstrado que isto se deve a qualidade dos aminoácidos presentes, e também usando métodos biológicos aplicados a animais e ainda ao homem (3). A alta qualidade das proteínas do lactosoro se deve ao bom balanceamento de aminoácidos, principalmente Lisina, Triptofano, e aminoácidos sulfurados (2, 15, 42, 49). Robinson (1976), indi-

ca que em 1974 a National Academy of Science, supos que durante o tempo em que 17,4g de proteína de ovos, ou 28,4g de proteínas de leite de vaca proporcionam as necessidades diárias de amino-ácidos para um homem de 70kg, somente são necessárias 14,5g de proteínas de lactosoro (45).

O valor do PER (Quociente de Eficiência Proteíca), dependendo dos métodos usados para a recuperação da proteína, varia de 2,9-3,1 encontrando-se superior ao PER da caseína (2,5) que é a proteína padrão. Kosokowisky (1977), indica que o valor nutritivo das proteínas do soro é o mais alto com exceção das proteínas do ovo, por isto é considerada uma excelente proteína animal(15, 31).

3. RECUPERAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO

Dos métodos de recuperação das proteínas do soro, o mais usado e econômico tem sido a desnaturação destas por aquecimento em meio ácido, seguido de filtração ou centrifugação, sendo posteriormente lavado e secado (36). Ao ocorrer a desnaturação, a fração coagulável precipita. O grau de coagulação, que afeta o rendimento do produto depende do pH e do tratamento térmico - (46).

A maior precipitação ocorre a pH 4,0-5,0 (16, 42, 46, 49, 53) , já que essa faixa de pH favorece a obtenção de um produto de baixo conteúdo de cinzas, devido a que os sais de cálcio nessas condições são solúveis (26). Para obter um produto de baixo teor de cinzas, Harwalker (1969), lavou o centrifugado com água a pH 3,5 eliminando assim quase toda a lactose e sais (26).

A relação tempo-temperatura para alcançar uma completa desnaturação das proteínas, tem que ser prolongada, pois apesar das imunoglobulinas serem completamente desnaturadas a 70°C, a desnaturação das lactalbuminas ocorre a 80-85°C (46). Sabe-se que a variação da temperatura com o tempo é uma relação semiloga - rítmica (28), devido a isto, na maioria dos casos o tratamento-térmico recomendado é de 85-95°C durante 15-20 minutos (16, 42, 46, 49, 53). Para aumentar o rendimento da proteína recuperável, alguns autores recomendam uma préconcentração do sôro de três vezes (6-7% de sólidos a 17-18%) (4, 36). Esta préconcentração só é recomendável do ponto de vista econômico, quando a recuperação da proteína faz parte de um processo de obtenção de lactose.

O uso de metais para precipitar a proteína do sôro também tem sido usado desde a tempos. Block et al (1953), precipitou a proteína em condições ácidas com sais de Al, Ba, Cd, Cu, Zn, Pb e

Fe; verificando que a precipitação com FeCl_3 era a mais vantajosa pela quantidade de proteína precipitada (14). Posteriormente outras pesquisas foram feitas com o objetivo de fortificar o soro com Fe. Imado et al (1962), adiciona FeCl_3 ao soro, e em forma líquida usa-o para fortificar leite fluído, leite em pó e fórmulas infantis (27). Jones et al (1972), precipita as proteínas do soro com ferripolifosfato, mas obtém um produto com baixo conteúdo de proteína e uma alta porcentagem de fósforo, que pode afetar as funções do fígado, principalmente em crianças (29). Amatea et al (1974), depois de adicionar FeCl_3 ao soro préconcentrado, precipita as proteínas por aquecimento a 92°C por 15 minutos obtendo um produto fortificado com Fe de alto conteúdo de proteína ($>80\%$)(4).

4. FORTIFICAÇÃO DO SORO

Em vários países a fortificação dos alimentos tem sido adotada para manter as ingestões dietéticas da população em níveis adequados e assim combater as enfermidades específicas de deficiência (50). Das enfermidades provocadas por deficiência de minerais na alimentação, a mais comum entre mulheres e crianças, é a anemia por deficiência de Fe ou anemia hipocrômica - ferropriva, que consiste na diminuição do conteúdo de hemoglobina (Hb) e na redução do tamanho e/ou número de glóbulos ver-

melhos no sangue. O critério mais comum para definir a anemia ferropriva é a concentração de Hb, embora tenha suas limitações, já que o valor da Hb como indicador de anemia hipocrômica ferropriva é menor a medida que diminui a carência de Fe. Esta anemia provoca debilidade, má saúde e redução da atividade corporal (6, 12, 13, 21, 37, 41). A ingestão diária de Fe sugerida pela FAO/OMS (Recommended Dietary Allowance, RDA)(21) é:

Homens adultos	5- 9 mg
Mulheres	14-28 mg
Crianças de 7-9 anos	5-10 mg
Adolescentes de 13-15 anos	12-24 mg

Na América do Sul, a anemia ferropriva se calcula em 5-15% para homens, 10-35% para mulheres e 15-50% em crianças. Nos E.U.A. a anemia alcança uns 20% da população, na Europa a anemia em mulheres é de 10-25% (13). Acosta et al (1974), estudando a situação nutricional em crianças americanas de descendência mexicana em idade pré-escolar, concluiu que quase 44% delas não alcançava 2/3 das U.S.RDA para Fe (1).

O Fe é um nutriente essencial que desempenha duas funções específicas muito importantes, a de transportar oxigênio desde os pulmões até os tecidos, e no processo de respiração celular. A

primeira destas funções é desempenhada pelo Fe da hemoglobina. A hemoglobina é uma metaloproteína contendo um grupo heme (ferriporfirina) ligada a proteína. O Fe se combina com o oxigênio no pulmão, o qual é liberado nos tecidos (32).

A anemia por deficiência de Fe é muito comum, devido principalmente ao Fe estar distribuído em pequenas quantidades, e também ao aumento das perdas de Fe por infestação parasitária (37). De acordo com a U.S. RDA, não se tem uma absorção adequada de Fe com a ingestão de alimentos comuns, já que uma dieta regular contém não mais de 6mg de Fe/1.000 kcal. Além da pouca quantidade de Fe ingerido deve-se considerar que a absorção de Fe pelo organismo, geralmente é de 5-15%. Esta absorção pode ser melhorada pela presença de proteína animal, ácido ascórbico, substâncias redutoras e grupos sulfidrilo na dieta (6, 11, 20, 21, 32).

Ainda em alimentos nutricionalmente excelentes, como o leite, o conteúdo de Fe é baixo. Webb (1965) e Krause et al (1973), indicam que o leite é uma pobre fonte de Fe para humanos (32,53). O conteúdo de Fe durante o período de lactação, varia de 500-560 μ g/L (51). Todavia, esse conteúdo no soro é menor, variando de 194 - 256 μ g/L., devido a caseína reter uns 33-42% de Fe (51).

Já que as dietas habituais são insuficientes para cobrir os ní-

veis de Fe recomendados pela FAO/OMS, e a U.S. RDA, principalmente em mulheres e crianças, é necessário a fortificação com Fe da maioria dos alimentos, ou um suplemento adicional de Fe (20, 32). Quando se fortifica um alimento para elevar sua efetividade, tem-se que considerar a forma de Fe adicionado, a natureza do produto, e a composição do resto da dieta (50). Além disso, deve-se prestar especial atenção aos indivíduos com diminuição na regulação da absorção de Fe, como ocorre na hemocromatose, e na talassemia (37). Estudos feitos na UNICAMP por Ramalho (1976), demonstram que entre os descendentes de italianos principalmente, a prevalência de talassemia é elevada. Nestes casos o nível baixo de Hb não indica uma anemia ferropriva, e a medicação a base de Fe é ineficaz, além de oferecer o risco potencial de causar hemossiderose (43).

O Fe geralmente é ingerido em estado férrico, quase sempre formando complexos com aminoácidos e ácidos orgânicos; no meio ácido do estômago é reduzido ao estado ferroso, separando-se do complexo. Uma vez reduzido se une a um agente quelante (frutose, sorbitol, aminoácidos) para ser então absorvido pelas mucosas intestinais. A quantidade de absorção de Fe parece estar controlada pelas mucosas intestinais, dependendo das necessidades corporais. O Fe absorvido une-se a transferrina (proteína do plasma) para ser conduzido uma parte a corrente sanguínea, e

uma outra parte levada aos depósitos onde se combina com a apoferritina formando ferritina. O Fe estocado pode ser novamente utilizado (5, 11, 32).

Pla e Fritz (1970), estudando a disponibilidade de Fe desde vários compostos, encontraram que tanto o FeSO_4 como o FeCl_3 são bem utilizados para regenerar Hb em ratos e pintinhos anêmicos (41). Block et al (1953), ao testar a proteína precipitada com FeCl_3 , demonstra que o Fe adicionado é tão efetivo, quanto o FeSO_4 na recuperação de Hb em ratos anêmicos, e que a alimentação em grandes quantidades (5.800ppm) administrada a ratos durante três semanas, não evidencia sinais de toxicidade (14). Imado et al (1962), não encontrou diferença nos valores de Hb em ratos alimentados com sulfato ferroso, citrato férrico, e os produtos férricos de sôro (27). Ao estudar o ferripolifosfato-(FPF) proteína como fonte de ferro, se observou que o Fe do FPF-proteína era altamente assimilável, e que se ingeridas até 720 ppm de Fe durante 90 dias não provocava efeitos patógenos de toxicidade (30). Amatea et al (1974), demonstra que a utilização do Fe da proteína do sôro fortificado, é semelhante a utilização do Fe desde o FeSO_4 (4).

No caso do lactosoro, os critérios adotados para usá-lo como agente fortificante de Fe são: que o Fe ingerido seja bem utili

zados e absorvido pelo organismo, e que o composto resultante - não tenha efeito contrário no produto em "flavor", cor , ou/e - estabilidade.

5. USOS

O uso da proteína de sôro desnaturada pelo calor, chamada - comercialmente lactalbumina, tem sido limitado por sua insolub*il*idade, textura arenosa, e em alguns casos por sua cor (55). En*tr*etanto é muito usada em várias formulações de alimentos, onde a proteína é requerida principalmente para cobrir necessidades nutricionais, nas quais as propriedades funcionais não são im*port*antes, como é o caso da elaboração de massas, onde a adição de proteínas de sôro não desnaturadas, causam defeitos na textu*ra* (19, 46).

A lactalbumina tem sido usada a tempos na elaboração de queijo de sôro, Ricota. É adicionada também ao queijo para aumentar o rendimento. A lactalbumina é usada ainda como "meat extender" em alimentos infantis, produtos de panificação ou biscoitos, ce*re*ais fortificados e massas (46). Amatea et al (1974), usa a proteína fortificada com Fe em pão a nível de 30mg/454g de pão- (4). Jones et al enriquece leite pasteurizado com FIF-proteína - em concentração de 10mg Fe/qt. de leite, podendo-se usar em fa-

rinhas e cereais (30). Em produtos de confeitaria a lactalbumina também se usa. Raccotta et al (1975), elabora no México "mazapanes" a base de lactalbumina para merendas escolares (42).

Quando se deseja proporcionar alguma propriedade funcional a um produto, recorre-se às proteínas de lactosoro nativas. Os principais usos destas proteínas nativas são: em produtos de panificação, proporcionando "flavor", cor, coesão, e aumento na viscosidade. Em produtos cárneos atuam como emulsificante, gelificante, e melhoram a absorção de água e gordura. Devido a sua solubilidade em diferentes pH, são muito usadas em bebidas carbonatadas e não carbonatadas. Em massas e sopas aumentam a viscosidade e atuam como emulsificante. Mascaram o "flavor" da soja quando usadas como texturizador de proteínas vegetais. Em produtos de confeitaria, dão "corpo", acentuam o "flavor", especialmente de chocolate e baunilha. Substituem os sólidos desengordurados do leite em sorvetes, proporcionando estabilidade (7, 17, 19, 35).

MATERIAIS E MÉTODOS

Lotes de 2 l de sôro doce (pH 6,5-6,7), coletados no laboratório mediante a precipitação da caseína com renina, foram desnatados em uma "Garver Electrífugue" a 836 ± 25 rpm. O pH foi acertado num "pH meter ESIL Titriskop" a diferentes valores, agregando determinadas quantidades de solução de FeCl_3 a 30% (p/v), e HCl diluído 1:1 (v/v). O sôro foi submetido a diversos tratamentos térmicos e resfriado a 55°C . Em cada caso a proteína precipitada foi centrifugada a 2.000 rpm por 15 minutos numa "Damon IEC UV Centrifugue" e do sobrenadante determinou-se nitrogênio, para conhecer a porcentagem de proteína recuperada. O precipitado foi decantado, lavado com água a pH 3,5 e secado em estufa a vácuo, ou ao meio ambiente.

O pH foi variado de 2,5-7,0 (o pH de 7 foi ajustado com NaOH 0,1 N). Os tempos de aquecimento foram de 5-40 minutos e as temperaturas de 70 - 95°C . O FeCl_3 agregado variou de 0,11-10 ml/l de sôro. Estes ensaios foram feitos com sôro sem concentrar, e com sôro concentrado a 15-18% S.T. Neste último caso o sôro foi concentrado num "Rotavapor RE Büchi" a 42°C .

Uma vez obtidas as condições ótimas de recuperação da proteína ,

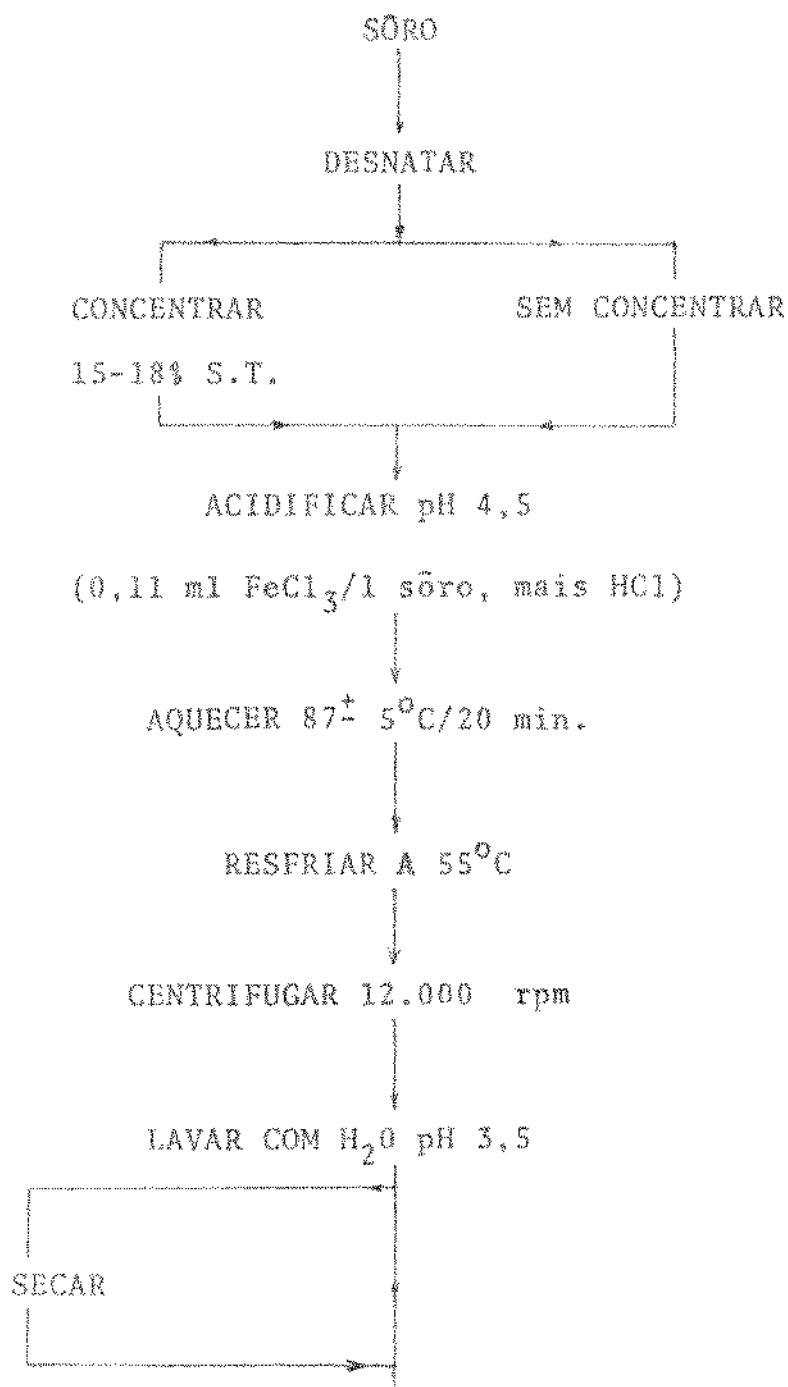
estudou-se a elaboração do pudim. A proteína (seca ou úmida), - foi dissolvida em água a diferentes concentrações. Homogenizou-se em um liquidificador "Sunbean" durante 3 minutos e na suspensão formada adicionou-se açúcar, corante, baunilha e farinha de milho "Maizena", fécula de mandioca modificada (Lorenal 75), ou carragenano. Aqueceu-se a ebulição e resfriou-se em moldes.

De acordo com os resultados obtidos, o método adotado para trabalhar a nível piloto se mostra no Quadro III.

A nível piloto fez-se 20 provas de 100 litros cada. O sôro desnatado numa "De Laval Gyrotester" de 12.000 rpm e acidificado a pH 4,5, foi aquecido a $87 \pm 5^{\circ}\text{C}$ num tanque com camisa de vapor de 100 litros de capacidade. O precipitado, depois de resfriado a 55°C , se decantou e centrifugou na "De Laval Gyrotester". A proteína foi lavada com água a pH 3,5 e secada em meio ambiente. Quando se concentrou o sôro a 15-18% S.T., usou-se o evaporador centrífugo "Centriterm CT 1B-2 Alfa Laval".

Do sôro determinou-se: pH, %S.T., nitrogênio solúvel; e a proteína obtida: % umidade, cinzas, nitrogênio, ferro e rendimento /litro de sôro. Para o cálculo da porcentagem total de proteína, foi usado o fator 6,25 (14, 16, 29, 31, 45, 55).

QUADRO III. FLUXOGRAMA DO PROCESSO SEGUIDO



1. MÉTODOS QUÍMICOS

NITROGÊNIO.

O nitrogênio foi determinado pelo método micro Kjeldahl descrito no AOAC 1970 (10), usando mistura catalizadora composta por K_2SO_4 , $CuSO_4$ e Se. A quantidade de amostra quando sólida foi de 0,2 g, sendo líquida de 5ml.

NITROGÊNIO TOTAL SEM CASEÍNA (N_t sem caseína).

Num becker de 125 ml, medir 10 ml de leite, 80 ml de água a 40°C e mais 1 ml de solução de ácido acético a 10%. Depois de 10 minutos agregar 1 ml de acetato de sódio 1 N. Filtrar e do líquido - filtrado tomar uma alíquota para determinar N (53).

NITROGÊNIO NÃO PROTEICO (NNP).

Adicionar a uma quantidade de soro, a mesma quantidade em ml de TCA 0,8 N ou 13,6%. Deixar em repouso uma hora para haver uma precipitação do nitrogênio solúvel, filtrar e do filtrado retirar uma alíquota para determinar N (45, 53).

NITROGÊNIO SOLÚVEL ($N_{solúvel}$).

Determina-se por método indireto (45, 53).

$$N_{solúvel} = N_t \text{ sem caseína} - NNP$$

UMIDADE

As amostras foram colocadas na estufa a 110°C até peso constante. A porcentagem de umidade foi calculada por diferença de pesos, segundo o método AOAC 1970 (10).

CINZAS

As amostras foram pesadas em cadinho de porcelana, queimadas em bico de Bunsen e colocadas na mufla a 550°C por 6 horas. A porcentagem de cinzas foi calculada por diferença de pesos, segundo o método AOAC 1970 (10).

DETERMINAÇÃO DE FERRO

O ferro foi determinado na proteína de sêro de queijo e no sangue dos ratos, usando-se o método de absorção atômica descrito no AOAC 1970 (10), e nas recomendações do manual do próprio aparelho de absorção atômica (39).

a) Determinação de Fe na proteína de sêro de queijo.

a₁) Aparelho. Espectrofotômetro de absorção atômica "UNICAM SP - 90A séries 2 PERKIN ELMER".

a₂) Condições instrumentais padrões para Fe.

Comprimento de onda 248,3 mμ

Bico	Acetileno, 10 cm
Altura do bico	1,0 cm
Largura da ranhura	0,1 mm
Combustível	Pressão do acetileno 0,7 kg/cm ² ; fluxo 1.000 cc/min.
Ar	Pressão 2,1 kg/cm ² ; fluxo 5ℓ/min.

a₃) Reagentes. Solução padrão de Fe 1.000 mg/litro (1.000g/ml). Dissolver 1.000 g de fio de ferro puro em aproximadamente 30 ml de HCl 6 N com ebulição. Diluir a um litro. Com esta solução, preparar a curva de calibração na faixa de 0-20 µg/ml.

a₄) Método. Uma grama de amostra se coloca em um cadinho de porcelana, se queima em bico de Bunsen e se submete a inigção - por 6 horas em mufla elétrica. As cinzas são dissolvidas com HCl 2 N; filtra-se em balão volumétrico de 100 ml, e lava-se com água. Lê-se absorção diretamente ou dilui-se com HCl 0,5 N para obter soluções na faixa de concentração desejada.

a₅) Cálculo.

$$\% \text{ Fe} = \frac{(\mu\text{gFe/ml})(F)}{(\text{amostra})(10.000)}$$

$$F = \frac{(\text{ml originais dil.})(\text{ml finais dil.})}{(\text{ml de alíquota, se os 100ml originais são diluídos})}$$

b) Determinação de Fe em sangue. As condições padrão, aparelho, solução padrão, e curva de calibração, são as mesmas do método anterior ($a_1 - a_3$).

b₁) Método. Se utilizaram 5 ml de HCl 0,2 N e 0,02 ml de sangue retirado da cauda dos ratos. Lê-se diretamente absorção e dá-se o resultado em μ g/ml.

HEMOGLOBINA (Hb)

A porcentagem de Hb no sangue dos ratos, foi determinada usando-se a seguinte relação com o fator 3,34, devido a que a Hb contém 3,34 mg de Fe por g de Hb (24).

$$\% \text{ Hb} = \frac{(V_{\text{amostra}}) (\mu\text{gFe/ml})}{(\text{ml amostra}) (33,4)}$$

2. MÉTODOS BIOLÓGICOS

Para testar a qualidade da proteína, fez-se dois tipos de en

saio: Quociente de Eficiência Proteica (PER) e disponibilidade de ferro.

QUOCIENTE DE EFICIÊNCIA PROTEICA (PER)

Se usaram ratos machos raça "Wistar", desmamados com 20-22 dias de idade (peso 30-45g), procedentes do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-SP. Grupos de 8 ratos foram mantidos em gaiolas individuais com água e ração "ad libitum". A caseína (Indústria e Comércio de Laticínios Tactry, Ltda.), foi usada - como padrão. Calculou-se ao final de 28 dias, o valor PER que é o quociente do ganho em peso, pela proteína consumida. Os valores encontrados, foram corrigidos para caseína igual a 2,5.

A composição em porcentagem das dietas utilizadas para a determinação do valor PER está especificada no Quadro IV.

QUADRO IV. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA DIETA PARA DETERMINAR PER^a.

COMPONENTE	%
PROTEÍNA	10
ÓLEO COMERCIAL ("Primor")	8
MISTURA VITAMÍNICA (Ver Quadro V)	2
MISTURA SALÍNICA (Ver Quadro VI)	4
SACAROSE (Açúcar "União")	25
AMIDO DE MILHO (Refinações de Milho Brasil)	51
TOTAL	100

a. Antunes, P.L. Tese de Mestrado. Campinas S.P. 1974

A composição da mistura vitamínica usada, foi de Warner (52), e está discriminada no Quadro V.

A composição da mistura salínica foi calculada baseando-se no trabalho de Roger e Harper (47), e se mostra no Quadro VI.

QUADRO V . COMPOSIÇÃO DA MISTURA VITAMÍNICA USADA PARA EN-
SAIOS BIOLÓGICOS.

COMPONENTE	g/kg de ração
VITAMINA E	5,0
VITAMINA K	1,5
VITAMINA B ₆	0,5
VITAMINA B ₁₂	0,00166
VITAMINA A	1,8 (50.000 UIg)
VITAMINA D	0,25 (40 Mio UIg)
INOSITOL (meso)	2,00
NIACINA (Ac. pantotênico)	2,00
RIBOFLAVINA	0,50
CLOROHIDRATO DE TIAMINA	0,05
BIOTINA (Vit. H)	0,02
ÁCIDO FÓLICO	0,10
PANTOTENATO DE CÁLCIO	2,00
ÁCIDO p-AMINOBENZOICO	2,00
CLOROHIDRATO DE COLINA	75,00
ÁCIDO ASCÓRBICO (Vit.C)	45,00
ETOXIQVIN	20,00
TOTAL	158,17

Adicionar na mistura vitamínica 420,915 g de farinha de mandioca e mais 420,915 g de açúcar para dar um total de 1 kg.

QUADRO VI. COMPOSIÇÃO DA MISTURA SALÍNICA USADA PARA EN-
SAIOS BIOLÓGICOS.

MOLIBIDATO DE AMÔNIO $4H_2O$	0,003
CARBONATO DE CÁLCIO	29,290
FOSFATO DE CÁLCIO $2H_2O$	0,430
SULFATO CÚPRICO	0,156
CITRATO FÉRRICO $6 H_2O$ (§)	0,623
SULFATO DE MAGNÉSIO $7 H_2O$	9,980
SULFATO DE MANGANÊS H_2O	0,121
IODETO DE POTÁSSIO	0,0005
FOSFATO DE POTÁSSIO	34,310
CLORETO DE SÓDIO	25,060
SELENITO DE SÓDIO $5 H_2O$	0,002
CLORETO DE ZINCO	0,002

(§) No ensaio de disponibilidade de ferro, suprimiu-se este componente.

DISPONIBILIDADE DE FERRO

Utilizou-se ratos machos raça "Winstler", desmamados com 20-22 - dias de idade (peso 25-36 g), da mesma procedência dos ratos usa dos para o ensaio de PER. Os ratos foram colocados durante três semanas em gaiolas de aço inoxidável, alimentados com água deionizada, e dieta carente de Fe até provocar uma anemia parcial - com uma redução de Hb superior a 50%.

A composição da dieta carente de Fe porcentual está indicada no Quadro VII.

QUADRO VII. COMPOSIÇÃO PORCENTUAL DA DIETA CARENTE DE FERRO^a.

PROTEÍNA (caseína comercial)	15
ÓLEO DE SOJA COMERCIAL ("Primor")	8
MISTURA VITAMÍNICA (Ver Quadro V)	2
MISTURA SALÍNICA LIVRE DE Fe (Ver Quadro VI)	4
SACAROSE (Açúcar "União")	25
AMIDO DE MILHO (Refinações de Milho Brasil)	46
TOTAL	100

a. Sgarbieri, V.C.; Antunes, P.L. UNICAMP, 1977.

Nas três semanas iniciais, determinou-se uma vez por semana o nível de Hb. Depois que os ratos ficaram parcialmente anêmicos ,

foram submetidos a dietas durante dez dias com 0,05%, 0,10% e 0,15% de Fe proporcionado pela proteína de lactosoro enriquecida com Fe. A porcentagem de proteína foi completada com caseína. Determinou-se o nível de Hb no início, com 5 dias, e ao término do ensaio. A disponibilidade de Fe foi expressada em % com respeito ao sulfato ferroso, usado como padrão.

ELABORAÇÃO DO PUDIM

O pudim foi feito de acordo com a formulação proporcionada nos boletins da Lorenz-National (34) e da Pierrefitte-Auby (40). A composição finalmente adotada foi a seguinte:

QUADRO VIII. FÓRMULA PARA A ELABORAÇÃO DO PUDIM.

PROTEÍNA	10,0 g
CARRAGENANO	1,0 g
AÇÚCAR	15,0 g
AMIDO	1,8 g
CORANTE	Adequado
BAUNILHA	0,3 ml

Preparação

1. Misturar bem os ingredientes.
2. Adicionar 100 ml de água fria.
3. Colocar em fogo médio, agitando constantemente até ficar gr~~o~~sso e atingir o ponto de ebulição.
4. Colocar em moldes e resfriar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho de tese divide-se em 4 estágios: padronização dos parâmetros de precipitação da proteína, ensaios químicos, ensaios biológicos e elaboração do pudim.

PADRONIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE PRECIPITAÇÃO DA PROTEÍNA

Os parâmetros que influenciam na precipitação da proteína são: TEMPERATURA (T), TEMPO (t), e pH. Devido ser a temperatura o mais crítico dos três, foi o parâmetro primeiramente estudado, fixando o tempo e o pH ($t = 20$ min.; $\text{pH} = 4,5$), de acordo com a maioria das literaturas mencionadas anteriormente.

Em todos os casos fez-se 4 experiências em triplicata, e a determinação do nitrogênio se fez do sobrenadante, depois de centrifugar a proteína precipitada. A porcentagem de N recuperado-se obteve por diferença entre o N_t sem caseína e o N do sobrenadante.

1. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

Foram feitos testes variando a temperatura, conservando o pH e o tempo constantes ($\text{pH } 4,5$; tempo 20 min.) como se indica no Quadro IX.

QUADRO IX. RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA A DIFERENTES TEMPERATURAS

(t = 20 min.; pH = 4,5)

T (°C)	70	75	80	85	90	92	95
% Rend.	33	34	38	55	65	67	68

Na Figura 2 mostra-se as variações da recuperação da proteína - em função da temperatura. A precipitação da proteína somente - ocorre a temperaturas maiores que 65°C, e na faixa de 70-80°C o aumento na recuperação é pequeno, já que nessas condições a des_naturação das proteínas é incompleta.

Devido ao ponto de ebulição do sôro ser de 96-97°C, e que acima de 92°C o aumento em recuperação é pequeno, a temperatura máxi_ma selecionada foi de 95°C. Na Figura 2 se observa que os melho_res resultados se obtêm a temperaturas de 90-92°C. No laborató_rio adotou-se a temperatura de 92°C, e a nível piloto, devido a dificuldade de atingir temperaturas altas decidiu-se trabalhar-na faixa de 85-88°C.

2. EFEITO DO TEMPO

Com a temperatura definida de 92°C, foi estudada a variaçã_o-

da recuperação da proteína em função do tempo, conservando o valor de pH de 4,5.

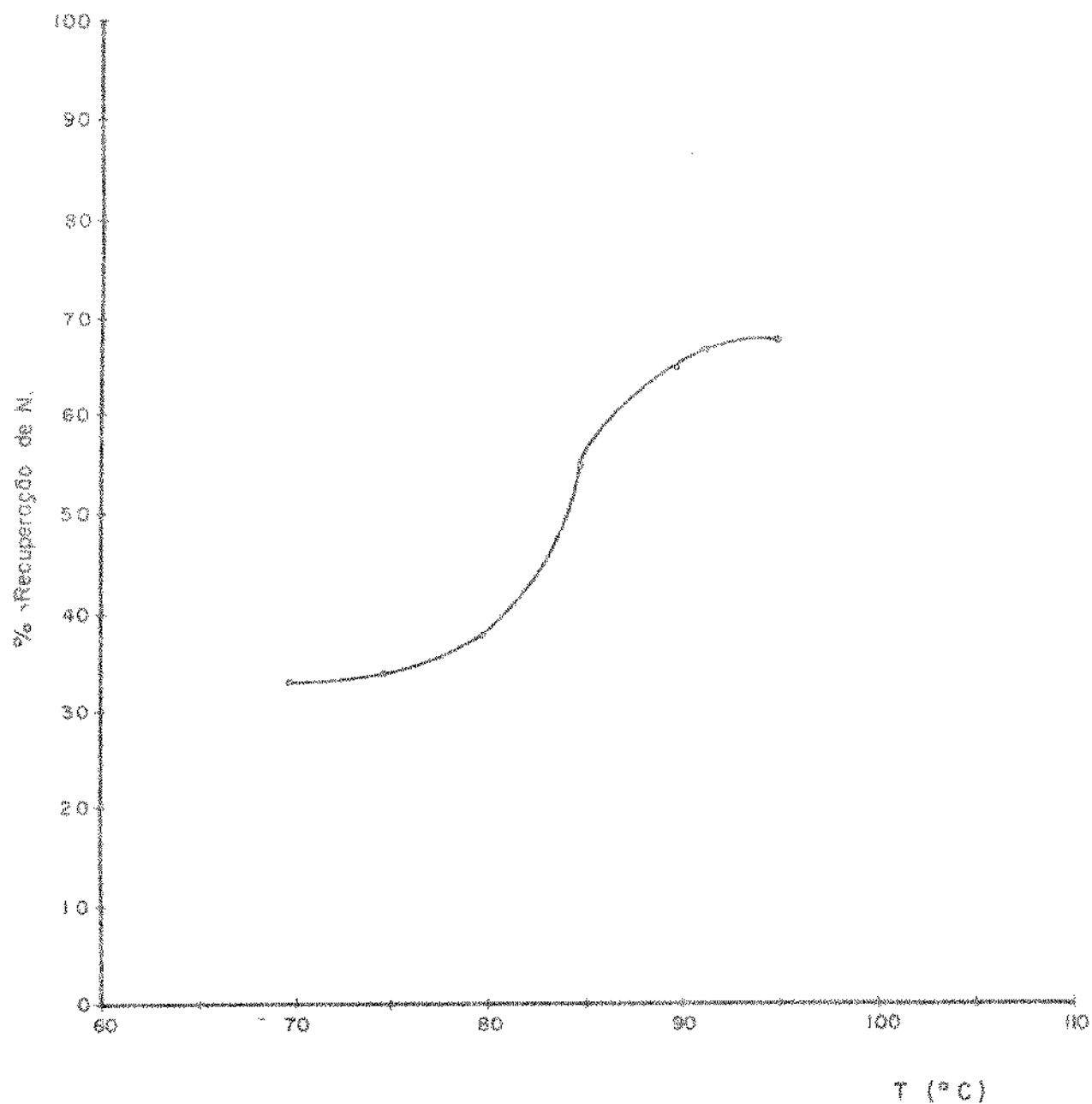


FIGURA 2. RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA A DIFERENTES TEMPERATURAS (t 20 min; pH 4,5)

Os tempos foram variados de 0-40 minutos, já que estudando tempos maiores o aumento da recuperação da proteína foi insignificante. Os resultados aparecem no Quadro X.

QUADRO X. RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA A DIFERENTES TEMPOS DE AQUECIMENTO (T 92°C; pH 4,5).

t (min.)	0	5	10	15	20	30	40
% Rend.	0	44	58	62	67	69	69

Os resultados indicam que a proteína recuperada aumenta rapidamente ao prolongar o tempo de aquecimento, até chegar a 20 minutos (Figura 3). A tempos maiores que 20 minutos, o aumento de recuperação da proteína é pequeno, mesmo com um tratamento térmico prolongado. De acordo com os resultados obtidos o tempo de aquecimento selecionado foi de 20 minutos.

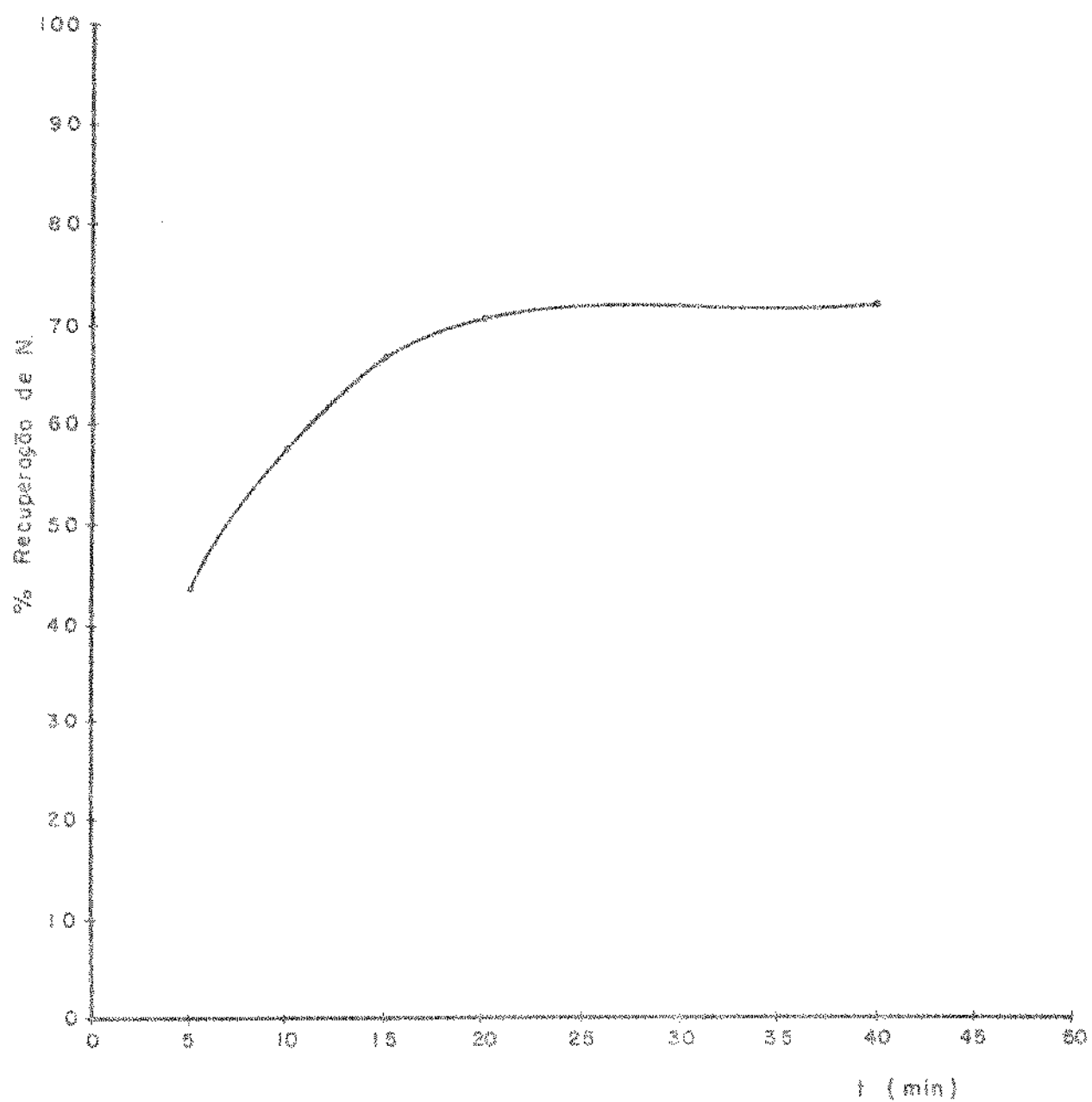


FIGURA 3. RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA A DIFERENTES TEMPOS DE AQUECIMENTO (T 92°C; pH 4,5)

3. EFEITO DO pH

Com o objetivo de encontrar um valor de pH, onde a precipitação da proteína seja alta, e ainda de manter os sais presentes em solução, já que ao estar precipitados estes podem afetar a aparência do pudim, a proteína foi precipitada em diferentes-pH mantendo-se constante a temperatura (92°C), e o tempo (20 minutos). Em cada caso determinou-se o conteúdo de cinzas para - conhecer a quantidade de sais presentes no produto (Quadro XI).

QUADRO XI. RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA A DIFERENTES pH E SEU CONTEÚDO DE CINZAS (T 92°C ; t 20 minutos).

pH	2,5	3,0	4,0	4,5	5,0	6,0	7,0
% Rend.	-	48,0	58,0	67,0	70,0	76,0	74,0
% Cinzas	-	0,68	0,69	0,75	0,89	4,57	4,60

Os resultados indicam que a recuperação da proteína aumenta conforme se eleva o pH, até um valor de pH 6,0 (Figura 4), entre - tanto o conteúdo de cinzas aumenta também (Figura 5).

De maneira a encontrar um valor de pH que proporcione um alto-

conteúdo de proteínas e uma porcentagem baixa de cinzas, considerou-se o valor de pH 4,5, pois este ao coincidir com o ponto isoelétrico da proteína faz com que a precipitação ocorra com maior facilidade. A valores mais altos de pH, os sais se formam insolúveis e provavelmente ocorra a formação de complexos com a proteína precipitada.

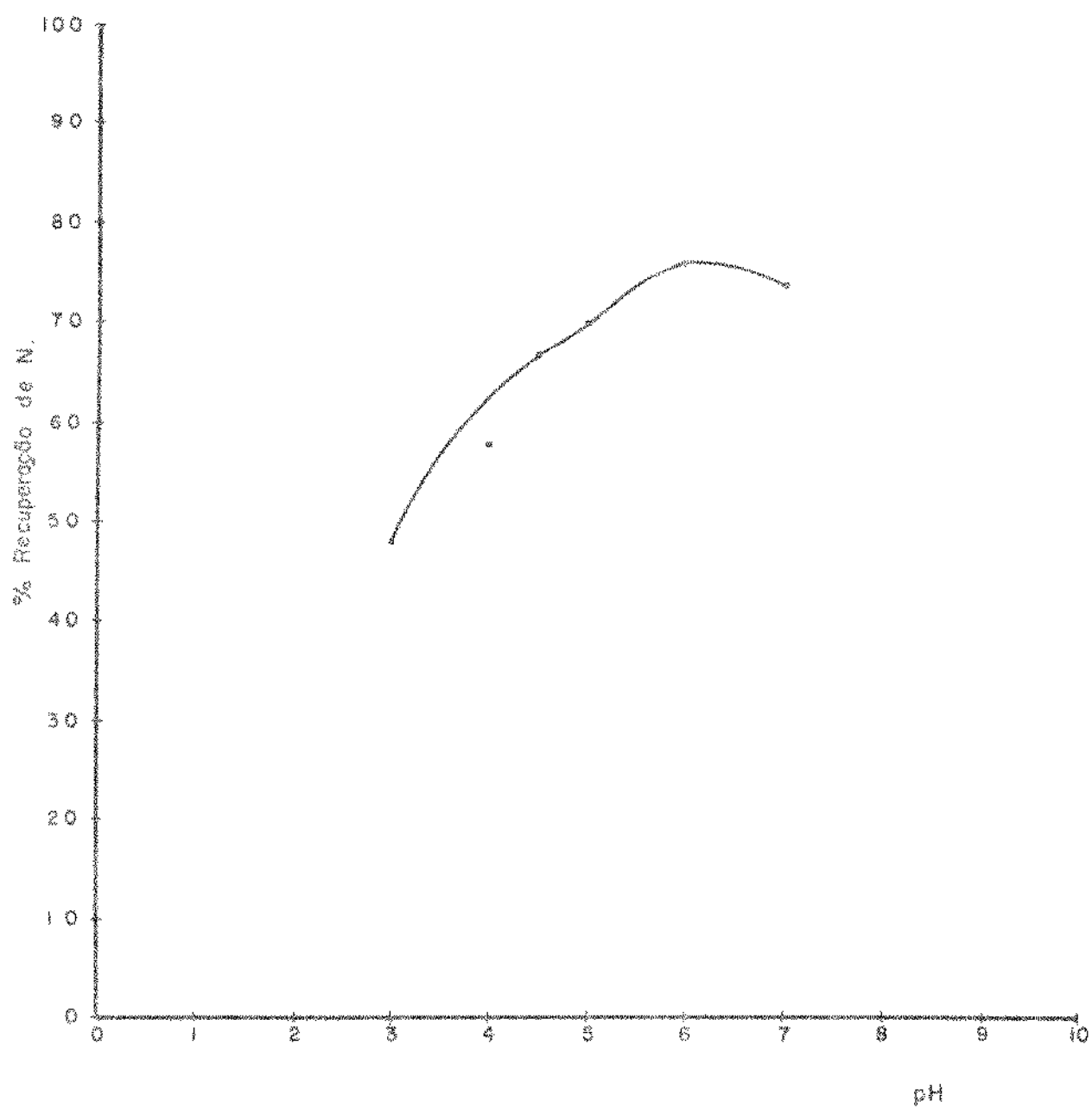


FIGURA 4. RECUPERAÇÃO DA PROTEÍNA A DIVERSOS
pH (T 92°C; t 20 min).

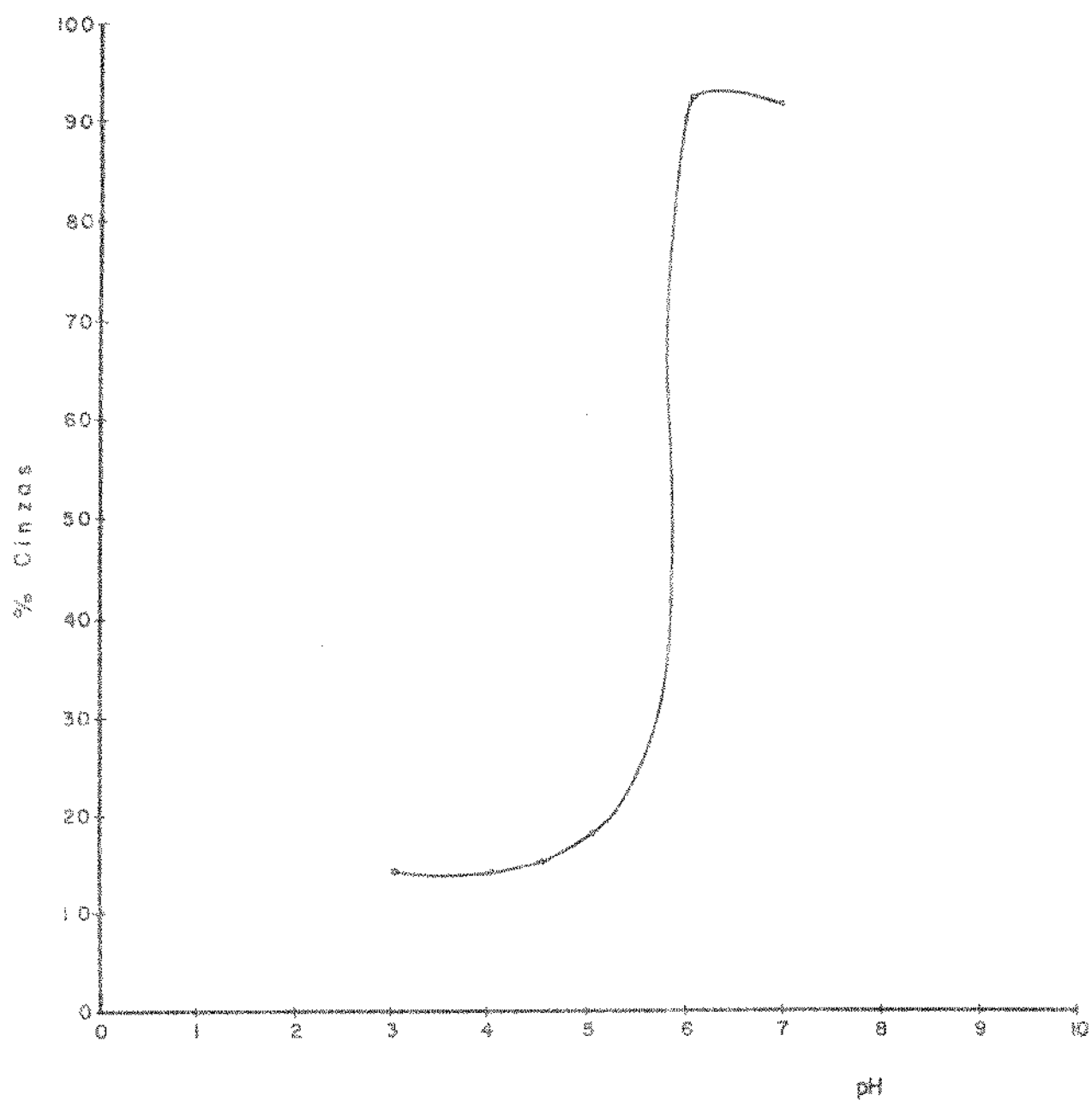


FIGURA 5. CONTEÚDO DE CINZAS A DIFERENTES pH.

4. ADIÇÃO DE FERRO

Estudos foram feitos para obter um produto com um conteúdo de Fe de $\pm 0,1\%$, para poder oferecer um produto alimentício que cubra as necessidades diárias recomendadas pela FAO/OMS, para crianças de 7-9 anos de idade de 10mg de Fe/dia, e com um alto conteúdo de proteína.

Teve-se especial atenção de não alcançar níveis altos de Fe, que pudessem apresentar perigos de toxicidade. Considerou-se que um valor máximo de 30 mg de Fe por pudim (± 25 g de proteína) não apresentariam nenhum risco, já que a ingestão máxima descrita, onde não existem sinais patológicos de toxicidade é de 5.800 ppm (14).

O Fe adicionado em todos os casos foi de uma solução de FeCl_3 a 30% (p/v), e a quantidade adicionada variou de 0,15-10,0 ml/litro de soro. O uso de FeCl_3 como fonte de Fe, foi selecionado - por considerá-lo um composto altamente assimilável pelo organismo, e a diferença do FeSO_4 para o FeCl_3 é que este não é tão reativo (37).

Os resultados estão no Quadro XII, e apesar de se obter uma precipitação sem aquecimento ao adicionar 10,0 ml de solução de FeCl_3 /litro de soro, o conteúdo de Fe na proteína recuperada é

muito alto, sua cõr é amarela e em 10-15 dias apresenta sinais de rancidez. Ao diminuir a quantidade de Fe adicionado, há necessidade de ajustar o pH a 4,5 e aquecer para precipitar a proteína. A cõr da proteína obtida é branca e não apresenta sinais de rancidez. O melhor resultado se obtém ao adicionar 0,15 ml de solução de FeCl_3 a 30%/litro de sôro.

QUADRO XII. ADIÇÃO DE FeCl_3 AO SÔRO E CONCENTRAÇÃO DE Fe NA PROTEÍNA OBTIDA.

FeCl_3 a 30% (ml/litro de sôro)	% Fe no produto	Observação
10,00	10,00 - 12,00	pH 2,5
1,00	0,95 - 1,10	pH ajustado com HCl
0,15	0,11 - 0,14	pH ajustado com HCl

5. CONCENTRAÇÃO DO SÔRO

Tentou-se experiências concentrando o sôro para estudar a influência na recuperação da proteína. No laboratório foram feitas três experiências e a proteína recuperada variou de 75,2 - 78,2 % (Quadro XII). A nível piloto fez-se uma experiência com uma recuperação de 72%. Devido a limitações técnicas não se pode fazer mais experiências que permitiriam obter uma conclusão. Além disso, depois de comprovar que a recuperação da proteína - sem concentrar era relativamente alta, a vantagem do ponto de vista econômico era evidente.

ENSAIOS QUÍMICOS

1. PROTEÍNA SOLÚVEL

Inicialmente foram feitos ensaios para determinar o conteúdo de proteína solúvel neste tipo de sôro. Depois de fazer 20 experiências, os valores obtidos aparecem no Quadro XIII.

De acordo com estes dados, os valores médios para N_t sem caseíína, NNP e proteína solúvel são:

N_t sem caseína	0,1156%
NNP	0,0334%
Proteína solúvel	0,5140%

QUADRO XIII. DETERMINAÇÕES FEITAS NO SÔRO PRODUZIDO NA ELABORAÇÃO DE QUEIJO DE MASSA SEMI-COZIDA E NA PROTEÍNA OBTIDA.

SÔRO (%)				PRODUTO (%)		
Nº	N _t	NNP	Prot.sol.	Proteína	Cinzas	Umidade
1	0,1120	0,0347	0,483	45,73	0,82	3,65£
2	0,1176	0,0358	0,511	48,27	0,57	2,00£
3	0,1148	0,0330	0,511	50,83	0,55	3,27£
4	0,1120	0,0330	0,494	52,48	0,74	3,63£
5	0,1176	0,0347	0,518	52,70	0,59	4,04£
6	0,1148	0,0392	0,473	54,26	0,56	7,80
7	0,1176	0,0364	0,508	55,20	0,45	7,10
8	0,1176	0,0392	0,490	57,24	0,65	6,72
9	0,1064	0,0338	0,441	57,74	0,62	6,40
10	0,1176	0,0347	0,518	58,27	0,55	6,87
11	0,1148	0,0358	0,494	59,84	0,66	6,28
12	0,1176	0,0347	0,518	59,97	0,64	6,42
13	0,1176	0,0347	0,518	60,00	0,67	6,89
14	0,1202	0,0364	0,525	61,11	0,71	7,01
15	0,1064	0,0336	0,455	61,85	0,86	6,77
16	0,1204	0,0341	0,539	62,42	0,78	7,45
17	0,1120	0,0364	0,473	68,30	0,71	7,23
18	0,1176	0,0347	0,518	75,20§	0,90	6,98
19	0,1204	0,0392	0,507	77,14§	0,93	7,08
20	0,1176	0,0341	0,522	78,12§	0,93	7,61

§ sôro concentrado

£ secado em estufa a vácuo

Estes valores concordam com a literatura referente aos sôros - produzidos na fabricação de queijos de massa semi-cozida (45).

2. UMIDADE

As amostras foram secadas em estufa a vácuo por 12 horas ou em meio ambiente por 2 dias. O conteúdo de umidade das amostras colocadas na estufa a vácuo foi de 2,00 - 4,04% (Quadro XIII) , ao mesmo tempo que as amostras secadas ao ar apresentavam um teor de umidade de 6,28 - 7,80%. Originalmente o produto foi secado na estufa a vácuo devido a baixa temperatura de secagem - ($42 \pm 5^{\circ}\text{C}$), porém ao comprovar que os resultados obtidos na secagem em meio ambiente eram satisfatórios, decidiu-se adotar este último método.

3. PROTEÍNA RECUPERADA NO PRODUTO

No produto sêco obtido, determinou-se N para saber a porcentagem de proteína recuperada. Os resultados estão no Quadro XIII e indica que os maiores resultados em laboratório se obtêm de sôro concentrado. Devido a isto, este processo é recomendado - quando o sôro se destina a obtenção de lactose, já que a presença de proteína no sôro afeta a cristalização da lactose (44).Entretanto como este trabalho está destinado unicamente a obtenção de proteína mediante um método econômico, trabalhou-se com sôro sem concentrar e a porcentagem média de proteína recupera-

da foi de 56,89%.

ENSAIOS BIOLÓGICOS

QUOCIENTE DE EFICIÊNCIA PROTEICA (PER).

Para determinar o valor PER que é o quociente do ganho em peso pela proteína consumida, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais durante 28 dias com água e ração "ad libitum".

O aumento de peso dos ratos se indica na Figura 6. A Figura representa as leituras médias de peso dos 8 ratos, ao início de 7, 14, 21 e 28 dias da experiência.

O valor PER da proteína de lactosoro, foi de 2,92 referida a caseína 2,5. Este valor obtido, 31,2% maior que o valor da caseína, indica que apesar de submeter-se a um processo de desnaturação, a proteína é altamente assimilável e que a adição de Fe na mesma não afeta a qualidade da proteína.

DISPONIBILIDADE DE FERRO

Depois de alimentar os ratos parcialmente anêmicos (3 grupos com 4 ratos cada; nível médio de Hb 9,1) durante 10 dias com a proteína de sêro fortificada com Fe a nível de 0,05%, 0,10% e 0,15%, determinou-se a porcentagem de Hb.

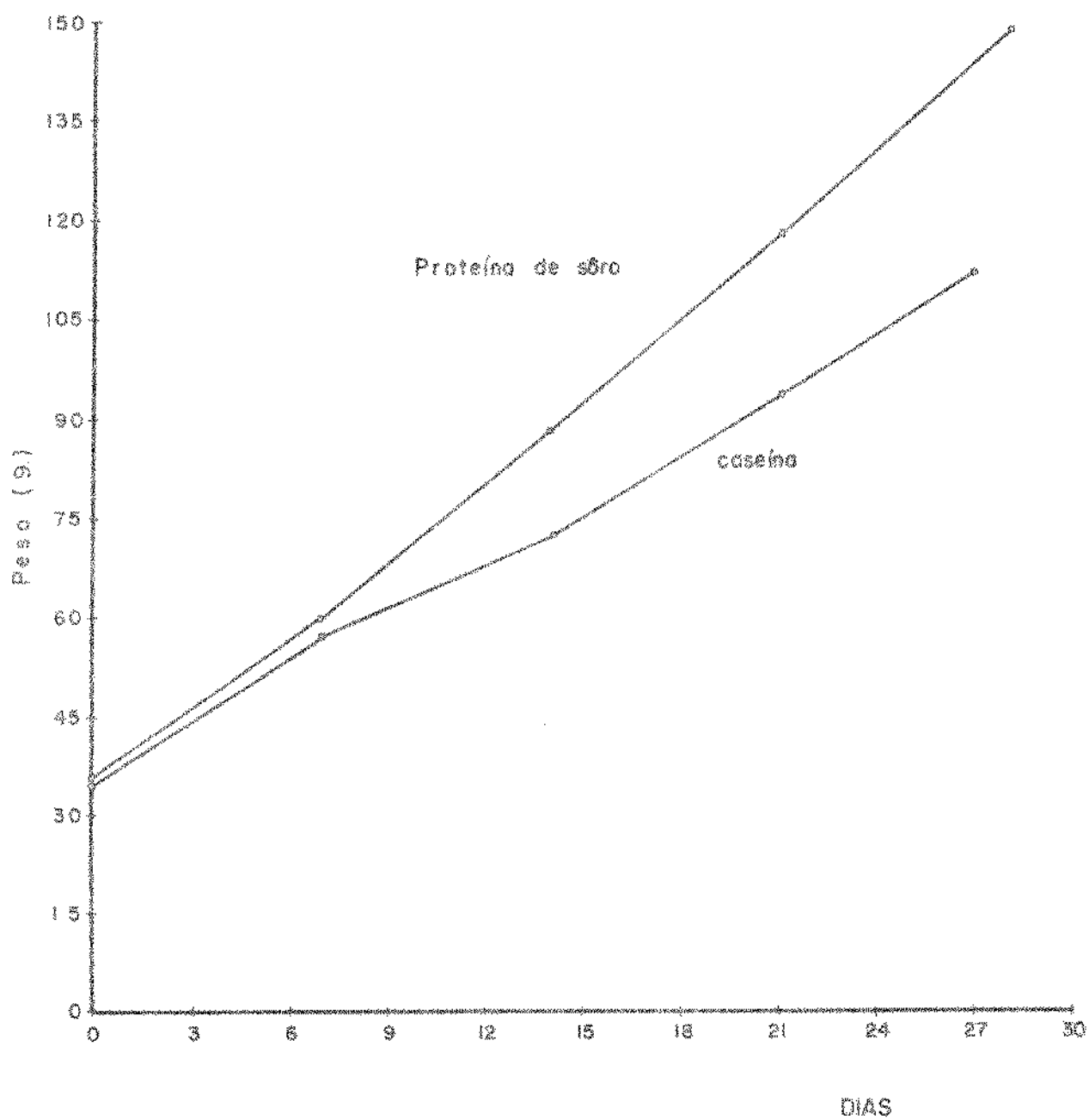


FIGURA 6. AUMENTO DE PESO DOS RATOS ALIMENTADOS COM A PROTEÍNA DE SORO DE QUEIJO.

Na Figura 7 se mostram os resultados da experiência, e indicam os valores médios de Hb para cada nível de Fe na dieta. A disponibilidade de Fe com respeito ao FeSO_4 , foi de 59,3%. Este valor determinado por Absorção Atômica, considerando o FeSO_4 - como padrão, concorda com a literatura (6, 41). Deve-se esclarecer que este é um valor relativo que somente indica a disponibilidade com respeito ao FeSO_4 . Além disso outro método de medição pode conduzir a resultados diferentes.

ELABORAÇÃO DO PUDIM

Para elaborar o pudim se determinou a concentração de carragenano, proteína e água necessária para obter um produto de características semelhantes ao pudim elaborado com leite.

No primeiro caso a concentração de carragenano foi variada de 0,3 - 1,5%, e o melhor resultado se obteve ao adicionar 1% de carragenano ficando uma consistência rígida.

A adição de proteína foi feita em base a quantidade de Fe desejado. Adicionou-se em concentrações de 5 - 25%, e finalmente a concentração selecionada foi de 10%, já que a valores maiores a consistência do pudim era mole. Para evitar que a proteína formasse grumos, foi homogenizada em liquidificador durante 3 minutos.

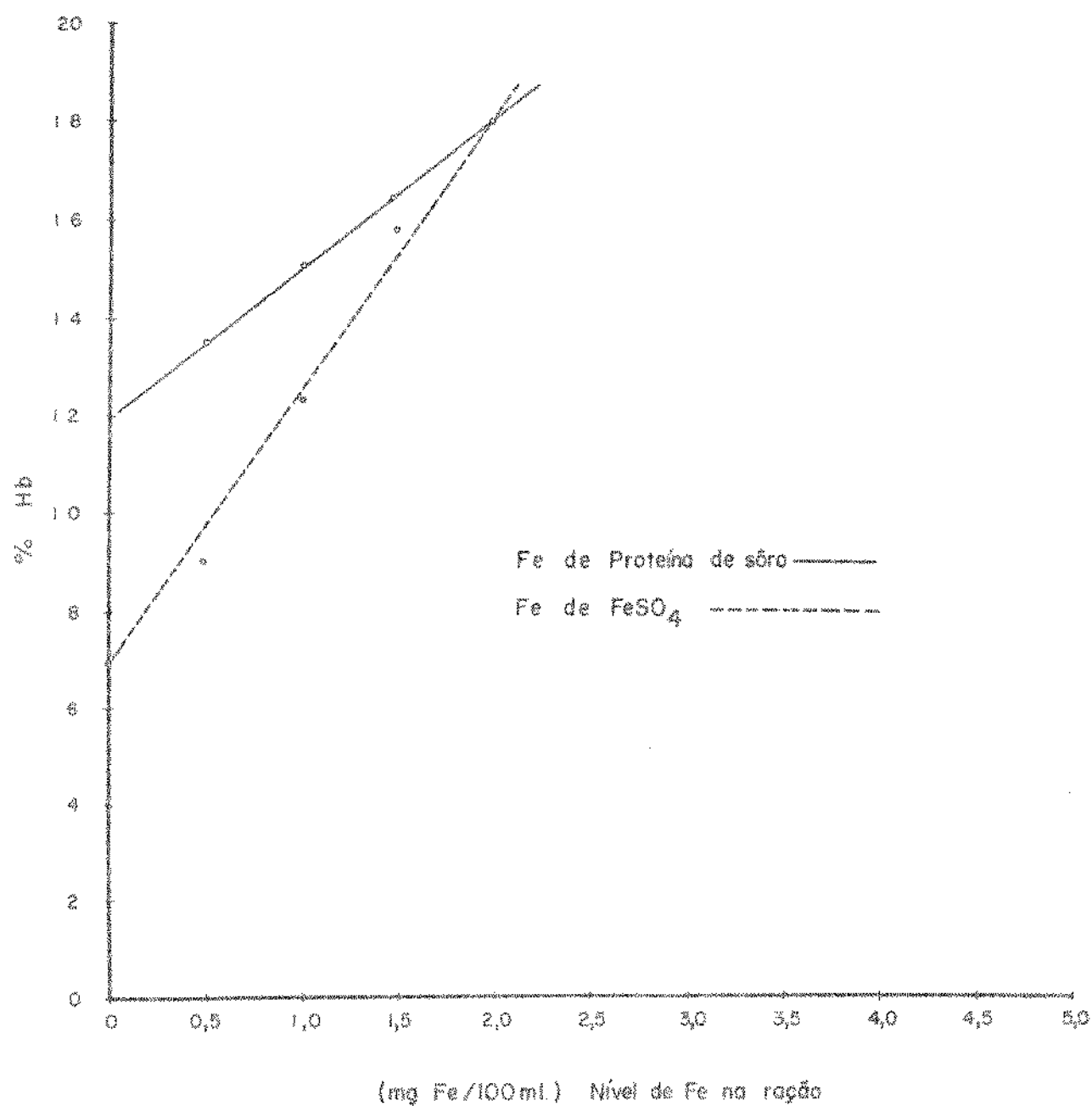


FIGURA 7. NÍVEL DE Hb DOS RATOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES PORCENTAGENS DE Fe.

A adição de amido de milho (Maizena), ou de fécula de mandioca modificada foi feita somente para dar "corpo" ao produto (e para evitar a retrogradação no segundo caso). O resultado com os dois tipos de amidos foi o mesmo, já que depois de três dias o pudim apresentava retrogradação. Devido a isto, decidiu-se usar amido de milho por ser um produto mais fácil de adquirir.

A cor foi proporcionada por corante vegetal (URUCUM), e o açúcar (UNIÃO) adicionado em quantidade para produzir um sabor doce (15%). Para obter um sabor ligeiramente acentuado de baunilha, foi necessário adicionar 0,3% de baunilha comercial. Substituiu-se totalmente o leite por água, para fazer um produto mais econômico.

A aparência do produto foi boa, mais quando foi submetido a degustadores (dez pessoas), a resposta foi unânime considerando um gosto aquoso, e uma textura arenosa, embora a proteína não tivesse influência nenhuma no sabor.

Devido ao fato do produto ter sido submetido a um processo térmico severo, e levando em conta que a nível de laboratório as normas de higiene são estritamente respeitadas, não foram efetuadas provas microbiológicas, contudo a nível industrial é recomendável a utilização do controle microbiológico, após obter-

se a proteína, e no momento do envase do pudim.

CONCLUSÕES

1. Os parâmetros de precipitação da proteína para os quais se obtém um melhor rendimento foram 92°C, 20 min. e pH 4,5.
2. Os parâmetros de precipitação obtidos proporcionam uma proteína de baixo conteúdo de cinzas, o que evita possíveis problemas de precipitação de sais.
3. A préconcentração do sôro, para obter maior rendimento, só é aconselhada quando o processamento do sôro exige concentração, como no caso da obtenção de lactose. De outra maneira a operação é antieconômica.
4. A adição de Fe na proteína obtida, não apresenta nenhum efeito adverso na mesma, já que o valor PER da proteína coincide com os valores para proteína sem Fe indicados na literatura.
5. O Fe agregado à proteína é altamente assimilável, segundo foi demonstrado mediante os ensaios biológicos efetuados com ratos.
6. A desnaturação sofrida pela proteína, devido a ação da temperatura a que foi submetida, foi mínima, já que a qualidade nutricional não foi afetada.

Pelas conclusões obtidas, fica determinada a viabilidade de aproveitamento da proteína do sôro destinada a várias faixas de idade, de acordo com a carência de Fe e proteína.

RECOMENDAÇÕES PARA FUTURAS EXPERIÊNCIAS

1. A fim de eliminar o gosto "aquoso" do "pudim", o leite deve ser substituído só parcialmente.
2. Para evitar a textura "arenosa" do "pudim" devida à proteína, seria preciso homogenizá-la perfeitamente e uma posterior - avaliação dos resultados.
3. A nível industrial deve adotar-se um controle microbiológico da proteína obtida, e do pudim no momento de seu envase, principalmente no referente a esporos termoresistentes.
4. Recomenda-se fazer um aminograma da proteína obtida, para - conhecer mais de perto o grau de desnaturação sofrido.
5. Considerando que o lactosoro desproteinado é uma rica fonte-de lactose, recomenda-se otimizar o processo, para obter conjuntamente proteína e lactose, o que seria muito vantajoso - do ponto de vista econômico, além de propor um aproveitamen-to total do sôro.

LITERATURA CITADA

1. ACOSTA, P.B., ARANDA, G.R., LEWIS, S.J., READ, M. Nutritional status of Mexican American preschool children in a border town. The American J. of Clin. Nutr. 27(12), 1359-1368. 1974.
2. ALAIS, C. Ciencia de la Leche. Principios de Técnica Lechera. Compañía Editorial Continental. España, 1971. Cap. IV.
3. ALAIS, C., BLANC, B. Milk Proteins: Biochemical and Biological aspects. World Review of Nutr. and Dietetics 20, 66-167. 1975.
4. AMATEA, G.F., KASON, C.M., NAKAI, S., BRAGG, D.B., EMMONS, D. B. Preparation of ferric whey protein by heating. Can. Inst. of Food Sc. and Tech. J. 7(3), 199-202. 1974.
5. AMEN, R.J. Trace minerals as nutrients. Food Prod. Develop. 7(5), 74-82. 1973.
6. AMINE, E.K., NEFF, R., HEGSTED, D.M. Biological estimation of available iron using chicks or rats. J. Agr. Food Chem. 20(2), 246-251, 1972.
7. ANON. Whey recovery: New way to profits. Food Eng. 46(5), 96-98. 1974.

8. ANON . An expanding future for whey as a source of human protein. Milk Ind. 75(4), 23-25. 1974.
9. ANTUNES, P.L. Algumas propriedades físico-químicas e nutricionais das proteínas da soja [Glycine max [L] Merril]. Tese de Mestrado. Campinas, S.P. 1974.
10. A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 1970. 11th. ed. Washington D.C.
11. BEAL, V.A. The iron controversy: should bread and flour be fortified? Food Prod. Develop. 9(4), 69-76. 1975.
12. BENDER, A.E. Proteins and Mineral Elements. In "Dietetic Foods" Chap. XII, XIV. Chemical Pub. New York, 1967.
13. BENGGOA, J.M. The state of world nutrition. In "Man food and nutrition". M.Rechcigl Jr. Ed. CRC Press. Washington D.C. 1976. p 7.
14. BLOCK, R.J., BOLLING, D., WEISS, K.W., ZWEIG, G. Studies on bovine whey proteins: I. Preparation of ferric derivatives of whey proteins. Arch. Biochem. Biophy. 47, 88-98, 1953.
15. BORTS, J.R. Milk proteins for use in the food industry. Food Tech. in Australia 23(11), 544-551. 1971.

16. CASALIS, J. Use of whey in the food industry. *Revista Española de Lecheria* nº 94, 221-233. 1975.
17. COX, A.C. Whey powder. *Food processing Ind.* 42(505), 49-51. 1973.
18. CRAIG, T.W., COLMEY, J.C., FRANCIS, L.H., HERLIHY, N.W. Development and product applications for a high protein concentrate from whey. *Food Prod. Develop.* 4(8), 92-94. 1971.
19. DELANEY, M.R.A. Composition, properties and uses of whey protein concentrates. *J. of the Soc. of Daiey Tech.* 29 (2), 91-101. 1976.
20. DEUTSCH, R.M. Nutritional Labeling. The National Nutrition Consortium, Inc. 1975.
21. FAO/OMS. Manual sobre necesidades nutricionales del hombre. Roma. 1975.
22. F.I.B.G.E. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil. Secretaria de Planejamento da Presidência da República. 1974.
23. FORSUM, E., HAMBREAUS, L. Nutritional and Biochemical studies of whey products. *J. of Dairy Sc.* 60(3), 370-377. 1977.
24. FRITZ, J.C., PLA, W., ROBERTS, T., BOEHNE, W.J., HOVE, E.L. Biological avaiabilidade in animals of iron from

- common dietary sources. J.Agr. Food Chem. 18(4), 647-651. 1970.
25. GILLIES, M.T. Utilization versus pollution. In "Whey processing and utilization. Noyes Data Corp. Park Ridge, New Yersey. 1974.
26. HARWALKAR, V.R., EMMONS, D.B. Low-ash lactalbumin as a by-product of lactose production. Can. Inst. Food Tech. J. 2(1), 9-11. 1969.
27. IMADO, M., JAJIMA, A., NAKAI, S. Improvement in methods of fortification of iron for infant feeding. Jap. J. Dairy Sc. 11:A177. 1962.
28. JENESS, R. Milk proteins. Effects of heat treatment on serum proteins. J. Agr. and Food Chem. 2(1), 75-81. 1954.
29. JONES, S.B., KALAN, E.B., JONES, T.C., HAZEL, J.F. Ferri polyphosphate as a whey protein precipitant. J. of Agr. and Food Chem. 20(2), 229-232. 1972.
30. JONES, S.B., KALAN, E.B., JONES, T.C., HAZEL, J.F., EDMONSON, L.F., BROTH, A.N., FRITZ, J.C. Ferripoliphosphate-whey protein powder. Their potential as nutritional iron supplements. J. of Agr. and Food Chem. 23(5), 981-984. 1975.
31. KOSIKOWSKI, F.V. Comunicação pessoal. UNICAMP. 1977.

32. KRAUSE, M.V., HUNCHER, A.M. The minerals. In "Food Nutrition and diet Therapy. W.B. Saunders Co. Philadelphia. Pa. 1972. pp.106-108.
33. LEMOS, J. Comercialização do leite em pó. Revista do Instituto de Laticínios C.Tostes nº 189(32), 3-18. 1977.
34. LORENTZ-NATIONAL. Boletim técnico. Lorenal 75. São Paulo, Brasil. 1977.
35. MANN, E.J. Whey utilization. Dairy Ind. International 40(12), 487-488; 41(1), 21-22. (2), 50-51. 1975. 1976.
36. MODLER, H.W., EMMONS, D.B. Properties of whey protein concentrate prepared by heating under acidic conditions. J. of Dairy Sc. 60(2), 177-184. 1977.
37. OMS Lucha contra la anemia nutricional, especialmente contra la carencia de hierro. Informe técnico 580. Ginebra. 1975.
38. OSBORNE, T.B., MENDEL, L.B. The nutritive value of lactalbumin. J. Biol. Chem. 59(13).
39. PERKIN ELMER. Method Sheets of Atomic Absorption Spectrophotometer. UNICAM SP 90A series 2.
40. PIERREFITTE-AUBY. Jellified milks and dessert creams . Bulletim. Paris, France. 1977.

41. PLA, G.W., FRITZ, J.C. Availabilily of Iron. J. of A.O.A.C. 53(4), 791-800. 1970.
42. RACCOTTA, V., RODRIGUEZ-ZENDEJAS, A.C. Recovery of rennet-cheese whey as a food for children (a lecture). Tecnologia de Alimentos (México) 10(5), 203-210. 1975.
43. RAMALHO, A.S. Investigação genético-epidemiológica das talassemias beta e delta-beta no Estado de São Paulo. Revista Paulista de Medicina. 88, 68-71. 1976.
44. REYNA, R.D. Comunicação pessoal. UNICAMP. 1977.
45. REYNA, R.D., SBODIO, O., CASTELAO, E., BACCHETTA, R., PERIN, O. Suero de queser a. Determinación de parâmetros fisicoqu micos. Rev. del Inst. de Tec. de Alim. de la Univ. Nal. del Litoral. Sep-Nov., 129-148. 1976.
46. ROBINSON, B.P., SHORT, J.L. MARSHALL, K.R. Traditional Lactalbumin. Manufacture, properties and uses. Review. New Zealand J. of Dairy Sc. and Tech. 11, 114-126. 1976.
47. ROGER, Q.R., HARPER, A.E. Amino acid diets and maximal growth in the rat. J. of Nutr. 87, 267-273. 1965.
48. SGARBIERI, V.C., ANTUNES, P.L. Disponibilidade biológica de metionina e Fe em variedades de Feij o Phaseolus vulgaris. Comunicação pessoal. UNICAMP. 1977.
49. SOUTHWARD, C.R., GOLDMAN, A. Co-precipitates. A review.

New Zealand J. of Dairy Sc. and Tech. 10(3), 101-112.
1975.

50. TEPLEY, L.J. Food fortification. In "Man, Food and Nutrition". M. Rechcigl Jr. Ed. CRC Press. Washington D.C. 1976. p 243.
51. UNNIKRISHNAN, V., BHINASENA, R. A comparative study on the content and association of natural iron in milk. *Milchwissenschaft* 32(3), 132-135. 1977.
52. WARNER, R.G. NAS/NRC. Publication N° 99, 51-81. 1962.
53. WEBB, B.H., JOHNSON, A.H. Fundamentals of Dairy Chemistry. 827 pp. The Avi. Pub. Co. 1965.
54. WHITNEY, R. McL., BRUNNER, J.R., EBNER, K.E., FARRELL, H.M. Jr., JOSEPHSON, R.V., MORR, C.V., SWAISGOOD, H.E. Nomenclature of the proteins of cow's milk. Fourth revision. *J. of Dairy Sc.* 59(5), 795-815. 1976.
55. WINGER, W.H., SAPERSTEIN, S., LUTWAK, L. Whey protein concentrate. Has excellent nutritional properties. *Food Tech.* 24(7), 758-764. 1970.