

ARTIGO

Viabilidade do método de biureto na determinação de proteínas em queijos: um estudo comparativo

The viability of the Biuret method for protein determination in cheese: a comparative study

BONINI, Heloísa Peraçoli¹ ; MASSAROLO, Kelly Cristina² 

¹Faculdade Donaduzzi, Assis Chateaubriand, PR, Brasil. ²Faculdade Donaduzzi, Toledo, PR, Brasil.

RESUMO: A determinação de proteínas em alimentos é importante tanto para a avaliação nutricional como também para garantir os padrões de qualidade do produto final. O método oficial, Kjeldahl, é preciso, mas demorado. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o método de Biureto como alternativa mais simples, rápida e econômica para a determinação de proteínas em queijos. Foram analisados três tipos de queijo (Camembert, Ricota e Tomme Negro D'Oeste) pelos dois métodos. Para avaliar o método foram determinadas exatidão e precisão, bem como testes prévios com diferentes solventes para extração de proteínas dos queijos. Dentre os solventes avaliados o hidróxido de sódio 0,5M demonstrou melhor desempenho. A exatidão foi maior na Ricota (73,4%), seguida do Camembert (35,0%) e Tomme Negro D'Oeste (29,4%). Todas as matrizes exibiram boa precisão (desvio padrão relativo < 10%). A extração das proteínas do queijo utilizando o solvente NaOH 0,5M, shaker a 40°C e 170 rpm por 15 minutos e vórtex por 1 minuto foi a mais eficiente, no entanto ainda apresenta baixa recuperação das proteínas do queijo, desta forma a determinação de proteínas de queijos utilizando o método colorimétrico de Biureto não é uma alternativa para substituir o método oficial.

Palavras-chave: química analítica, análise de alimentos, métodos alternativos, queijos, proteínas.

ABSTRACT: The determination of proteins in foods is important both for nutritional evaluation and for ensuring the quality standards of the final product. The official method, Kjeldahl, is accurate but time-consuming. Therefore, the objective of this study was to evaluate the Biuret method as a simpler, faster, and more economical alternative for the determination of proteins in cheeses. Three types of cheese (Camembert, Ricotta, and Tomme Negro D'Oeste) were analyzed using both methods. To evaluate the method, accuracy and precision were determined, as well as preliminary tests with different solvents for protein extraction from the cheeses. Among the solvents tested, 0.5 M sodium hydroxide showed the best performance. Accuracy was higher in Ricotta (73.4%), followed by Camembert (35.0%) and Tomme Negro D'Oeste (29.4%). All matrices exhibited good precision (relative standard deviation < 10%). Protein extraction from cheese using 0.5 M NaOH, shaking at 40°C and 170 rpm for 15 minutes, and vortexing for 1 minute was the most efficient; however, it still showed low recovery of cheese proteins. Therefore, the determination of proteins in cheeses using the Biuret colorimetric method is not a suitable alternative to replace the official method.

Keywords: analytical chemistry, food analysis, alternative methods, cheeses, proteins.

INTRODUÇÃO

A produção de queijos, um processo milenar que combina a arte e a ciência da fermentação, é um dos pilares centrais na indústria alimentícia, em especial a brasileira. O desafio contemporâneo reside na busca constante por qualidade, padronização e alimentação segura em um mercado em expansão (Pai & Jaiswal & Jaiswal, 2024). O aprimoramento das técnicas de produção, desde a seleção de matérias-primas até os processos de fermentação e maturação, tem sido acompanhado pela crescente demanda por métodos analíticos precisos e rápidos para garantir a conformidade com padrões de qualidade e regulamentações (Saraiva & Dutra & Barroso, 2023).

A determinação de proteínas é uma ferramenta fundamental na indústria de alimentos, tendo em vista sua função tecnológica e exigências na definição da qualidade nutricional dos alimentos (Day & Cakebread & Loveday, 2022). Dessa forma, órgãos regulamentadores como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) requerem a constituição nutricional dos alimentos para garantir a qualidade, isso inclui a determinação do teor de proteínas.

Ao analisar a composição proteica dos alimentos, especialmente no contexto da indústria de laticínios, como no caso dos queijos, é possível obter informações sobre sua qualidade nutricional, características sensoriais e comportamento durante o processamento. O teor de proteínas em queijos tem um impacto direto na textura, sabor e capacidade de derretimento, determinando a experiência sensorial e aplicação do produto (Gentile, 2020; El-Metwally & El-Menawy & Ismail, 2023). Além disso, a análise de proteínas em queijos é fundamental para aferir a autenticidade do produto, identificando adulterações ou substituições indesejadas.

No âmbito acadêmico e industrial, a determinação do teor de proteínas em queijos é abordada por meio de métodos analíticos variados, como o método Kjeldahl (ISO 8968-1, 2014), de espectrofotometria e técnicas cromatográficas.

O método de Kjeldahl é referência para análise de proteínas, que envolve a digestão das amostras com ácido sulfúrico para liberar o nitrogênio, que é quantificado e convertido em teor de proteína (Cechi, 2003).

Um dos métodos espectrofotométricos usuais para quantificação de proteínas é o Biureto. Esse método foi proposto por Riegler em 1914, o qual consiste na formação de um complexo de cor roxa entre um sal de cobre e a ligação peptídica da proteína em soluções alcalinas (Cechi, 2003). Este é resultante da substituição do hidrogênio da ligação peptídica de uma proteína por cobre II em meio alcalino (carbonato de cobre em meio alcalino) (Zaia & Zaia, 1998). Para que o complexo se forme são necessárias no mínimo duas ligações peptídicas. A cor produzida é proporcional à concentração das proteínas. Portanto, como a principal proteína do queijo é a caseína e apresenta essas características necessárias para reagir com o Biureto, esse método pode ser promissor para quantificar as proteínas dos queijos.

A escolha do método mais adequado depende dos objetivos do estudo e das propriedades específicas das proteínas. Com a crescente demanda por análises com o melhor custo benefício, principalmente, no que se refere a tempo e gastos, torna-se pertinente desenvolver métodos alternativos de determinação de proteínas. No entanto, para verificar se os métodos alternativos são adequados devem ser avaliados utilizando pelo menos os parâmetros de exatidão e precisão. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar um método alternativo espectrofotométrico para determinação de proteínas em queijos.

METODOLOGIA

Amostras

Para o estudo do método de determinação de proteínas foram utilizados três tipos de queijos, Camembert, Ricota e Tomme Negro D'Oeste. A escolha foi baseada nas características físico-químicas desses queijos, a fim de avaliar a influência da composição da amostra nos resultados de recuperação de proteínas.

O queijo tipo Camembert apresenta alto teor de gordura e umidade, a Ricota é um queijo com baixo teor de gordura e umidade; já o Tomme Negro D'Oeste possui média umidade e alto teor de gordura. Essas informações foram fundamentadas na Portaria do Ministério da Agricultura e Agropecuária nº 146 de 07 de março de 1996, que classifica o teor de gordura e umidade em queijos. Para avaliar se as variáveis gordura e umidade afetam o método alternativo de determinação de proteínas, esses componentes foram determinados nas amostras de queijos.

Determinação de gordura

A determinação de gordura nas amostras dos queijos foi realizada utilizando hidrólise ácida e leitura direta em butirômetro de Gerber (ISO 3433, 2008).

Determinação de umidade

O teor de umidade foi determinado com balança infravermelha na temperatura de 135° C (Bonini; Pais de Paula; Massarolo, 2025).

Determinação de proteínas pelo método oficial

Para a determinação de proteínas com o método oficial foi utilizado o método Kjeldahl (ISO 8968-1, 2014) e fator de conversão de nitrogênio para proteínas de 6,38.

Método alternativo para quantificação de proteínas

Extração de proteínas dos queijos

A primeira etapa consistiu em avaliar as condições mais favoráveis para a extração das proteínas dos queijos. As variáveis estudadas foram solventes e tipos de agitação. Para isso, inicialmente foram avaliados 4 diferentes solventes (etanol, cloreto de sódio 0,1%, água e hidróxido de sódio 0,1M). O reagente que propiciou maior extração de proteínas dos queijos foi o hidróxido de sódio 0,1M. Dessa forma, a próxima etapa foi avaliar duas concentrações do hidróxido de sódio (0,1M e 0,5M). Após, foi avaliado a variável tipo de agitação, utilizando shaker e vórtex e a combinação das duas agitações. A agitação em shaker foi realizada em temperatura de 40°C, velocidade de 170 rpm e tempo de 15 minutos, enquanto que o vórtex a agitação foi de 1 minuto para cada amostra.

Após definir os melhores parâmetros de extração para o método alternativo, foram realizadas determinações de proteínas com as mesmas amostras de queijos utilizando o método alternativo e oficial.

Quantificação de proteínas dos queijos

Para quantificar o teor de proteínas nos extratos foi utilizado o método colorimétrico de Biureto (Gornall et al., 1949). Para isso, inicialmente, foi construída uma curva padrão com diferentes concentrações de padrão de albumina na faixa de 0 a 2 mg/mL.

Após essa etapa, obteve-se a fração proteica (de albumina) das amostras. Para isso, 3g de cada queijo foi diluído em 20 mL de NaOH 0,1M, depois agitado em shaker por 15 minutos com temperatura de 40 °C a 170 rpm e centrifugado a 3100 rpm à 10 °C por 5 minutos. A amostra foi filtrada e ajustado volume em um balão de 25 mL com NaOH 0,1M. Após a extração, o próximo passo foi quantificar as proteínas com o reagente de Biureto.

Alíquotas do extrato foram adicionadas em tubos de ensaio, seguido da adição do reagente de Biureto e banho a 37°C por 10 minutos para auxiliar na reação.

Por fim, as absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm, e os valores foram utilizados para calcular o teor de proteínas utilizando a equação da reta obtida na curva padrão de albumina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os queijos tipo Camembert (33%) e Tomme Negro D'Oeste (31%) apresentaram os maiores teores de gordura, enquanto a Ricota (8,5%) o menor teor de gordura. O Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento estabelece as características físico-químicas de cada tipo de queijo por meio da Portaria nº 146 de 1996. Em relação a gordura, há a seguinte classificação: Desnatados: quando contenham menos de 10,0%, Magros: quando contenham entre 10,0 e 24,9%, Semigordo: quando contenham entre 25,0 e 44,9%, Gordos: quando contenham entre 45,0 e 59,9% e Extra Gordo ou Duplo Creme: quando contenham o mínimo de 60%. O queijo Camembert e Tomme Negro D'Oeste são considerados semigordos, e,

portanto, o valor encontrado para o teor de gordura de ambos está dentro dos parâmetros estabelecidos. O queijo Ricota é considerado um queijo desnatado, logo, o resultado também está de acordo.

Para o teor de umidade também há uma classificação. Queijos de baixa umidade: até 35,9% de umidade. Queijos de média umidade: entre 36,0% e 45,9%. Queijos de alta umidade: entre 46,0 e 54,9%. Queijos de muito alta umidade: umidade não inferior a 55,0% (MAPA, 1996). A Ricota apresentou o maior teor de umidade (67,0%), seguido do Camembert (40,4%) e Tomme Negro D'Oeste (34,5%). A umidade da Ricota foi coerente, pois é um queijo de muita umidade. Entretanto, o queijo Camembert por ser considerado de alta umidade e o Tomme Negro D'Oeste de média umidade.

Os teores de proteínas das mesmas amostras de queijos foram maiores quando utilizado o método oficial (Tabela 1), com teor de proteínas de 23,0% para o queijo tipo Tomme Negro D'Oeste, 19,3% para o Camembert e 14,9% para a Ricota.

Tabela 1. Teores de proteínas dos queijos obtidos por diferentes métodos.

Queijo	Método	Teor de Proteínas (%)	Exatidão (%)	Precisão (%)
Camembert	Oficial	19,3	--	--
	Alternativo	6,37	33,0	3,5
	*Alternativo	6,76	35,0	3,4
Ricota	Oficial	14,9	--	--
	Alternativo	7,94	53,2	9,9
	*Alternativo	10,96	73,4	5,2
Tomme Negro	Oficial	23,0	--	--
	Alternativo	6,78	29,5	2,7
	*Alternativo	6,75	29,4	5,6

* com adequação (inclusão do vórtex por 1 minuto durante a extração). Fonte: Autoria própria, 2024.

Ao utilizar o método alternativo com as adequações (inclusão do vórtex por 1 minuto no momento da extração), os maiores resultados de exatidão na extração e quantificação de proteínas foram obtidos em amostras do queijo ricota. A maior extração de proteínas foi na amostra com menor teor de gordura, isso pode ser explicado pelo fato que a principal proteína presente no queijo é a caseína, que é constituída por uma mistura complexa de diferentes fosfoproteínas (Nelson & Cox, 2022). Além disso, a gordura presente no leite está na forma de emulsão de óleo e água envolta por proteínas o que dificulta a extração. Dessa forma, pode-se afirmar que o menor desempenho do método alternativo está relacionado à dificuldade na dissociação da matriz proteica e lipídica, especialmente em queijos com maior

teor de gordura. Estudos indicam que a interação entre caseínas e lipídeos forma estruturas que reduzem a disponibilidade de proteínas para extração e quantificação (Landin et al., 2021). Esse fenômeno foi mais evidente nos queijos Camembert e Tomme Negro D'Oeste, que apresentaram exatidão menor (35,0% e 29,4%, respectivamente) quando comparados com a Ricota (73,4%) que é um queijo desnatado.

Dentre os solventes avaliados, o hidróxido de sódio foi o mais eficiente para extrair as proteínas dos queijos, isso se deve ao fato que é necessário uma hidrólise alcalina, a qual consiste em hidrolisar a ligação proteína-gordura e assim disponibilizar o composto de interesse para extração. Ainda assim, não foi suficiente para extrair todas as proteínas dos queijos com maior teor de lipídeos, em que essa gordura, provavelmente, reduz a disponibilidade das proteínas para interação com os reagentes alcalinos.

A adequação realizada no método alternativo, que foi inserir o vórtex por 1 minutos após o shaker, permitiu que a extração da proteína fosse mais eficiente. Para o queijo com menor teor de lipídeos (Ricota) a diferença dessa adequação foi o aumento da extração em 20,2%. Isso proporcionou que a extração de proteínas ficasse mais próxima do resultado oficial (73,4% do valor referência), enquanto que nos demais queijos a diferença em relação ao método oficial foi elevada, sendo provavelmente devido ao maior teor de gordura, obtendo-se apenas 29,4% de exatidão para o Tomme Negro e 35,0% de exatidão para o Camembert.

O impacto positivo da extração com inclusão da etapa de agitação em vórtex na eficiência do método alternativo obtido para a amostra Ricota é relevante, pois demonstra que a adequação na metodologia pode ser uma alternativa válida para amostras com menor teor lipídico. A agitação promovida pelo vórtex contribuiu para uma maior interação do solvente com as proteínas da matriz, facilitando assim a sua solubilização. No entanto, para queijos com teor mais elevado de gordura, pode ser necessária a adoção de solventes ou condições de extração mais agressivas, como um tempo de hidrólise alcalina prolongado ou o uso de agentes surfactantes que promovam uma emulsificação mais eficiente da matriz lipoproteica.

Comparando-se os métodos, observa-se que o método oficial requer uma hidrólise ácida utilizando ácidos fortes, como o ácido sulfúrico, para promover a degradação completa das proteínas e permitir sua quantificação com maior precisão. Esse processo assegura que toda a fração proteica seja solubilizada e quantificada com exatidão. Já o método alternativo, por sua vez, evita o uso de reagentes ácidos e propõe uma extração baseada na dissociação físico-química das proteínas por meio da alcalinização e agitação mecânica.

Dessa forma, analisa-se que uma das principais diferenças entre os métodos é o princípio químico da extração proteica. O método do Biureto, utilizado como alternativo, exige um meio alcalino, como o NaOH, pois sua reação ocorre na presença de íons cúpricos (Cu^{2+}) em pH básico. Em meio ácido, os íons cúpricos poderiam precipitar ou não interagir adequadamente com as ligações peptídicas, comprometendo a quantificação das proteínas. No método oficial, por outro lado, a hidrólise ácida fragmenta completamente as ligações

peptídicas, tornando a proteína mais acessível para quantificação, independentemente da matriz alimentar.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A extração de proteínas de queijos para quantificação em espectrofotômetro não é um método alternativo, pois não apresenta valores de exatidão aceitáveis. Além disso, os teores de recuperação do método foram afetados pelo teor de gordura do queijo. Novas pesquisas podem ser realizadas na tentativa de adequar ainda mais o método de extração para então realizar a quantificação com reagente de Biureto, sabendo-se que a relação das proteínas e gorduras pode interferir nos resultados.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Faculdade Biopark e bolsa de iniciação científica da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná.

REFERÊNCIAS

- Bonini, H. P.; Pais De Paula, L.; Massarolo, K. C. (2025). Método analítico alternativo para determinação rápida de umidade em queijos finos. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. v. 79, n. 03.
- Cechi, H. M. (2003). *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. Editora da Unicamp.
- Day, L.; Cakebread, J. A.; Loveday, S. M (2022). Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, v. 119, p. 428-442.
- El-Metwally, R. I.; El-Menawy, R. K.; Ismail, M. M. (2023). Correlation between free fatty acids content and textural properties of Gouda cheese supplemented with denatured whey protein paste. *Journal of Food Science and Technology*, v. 60, p. 590–599. DOI: 10.1007/s13197-022-05643-6.
- Gentile, L. (2020). Protein–polysaccharide interactions and aggregates in food formulations. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. DOI: 10.1016/j.cocis.2020.03.002.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, v. 177, p. 751-766.
- IDF 4:2004. Determination of the total solids content, International Dairy Federation, Brussels, BE.
- International Organization for Standardization. (2008). Cheese — Determination of fat content — Gerber method butyrometers (ISO Standard No. 3433). <https://www.iso.org/standard/43380.html>

- International Organization for Standardization. (2014). Milk and milk products—Determination of nitrogen content—Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation (ISO Standard No. 8968-1). <https://www.iso.org/standard/63366.html>
- Landin, T. B. et al (2021). Principais propriedades funcionais do queijo muçarela, queijo prato e requeijão culinário—uma revisão. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 76, n. 2, p. 118-130.
- Ministério da Agricultura e Agropecuária (Brasil). (1996, 7 de março). Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para a Categoria Madeira Serrada de Folhosas. *Diário Oficial da União*.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2022). *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Artmed Editora.
- Pai, A. S.; Jaiswal, S.; Jaiswal, A. K (2021). A comprehensive review of food safety culture in the food industry: leadership, organizational commitment, and multicultural dynamics. *Foods (Basel, Switzerland)*, v. 13, n. 24, p. 4078, 2024. DOI: 10.3390/foods13244078.
- Rabello, A. A. et al. Utilização da radiação infravermelha na secagem de amostras de banana. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 4, p. 39317-39330.
- Saraiva, M. C.; Dutra, S. Â.; Barroso, A. B (2023). O controle de qualidade na produção de queijo de Coalho no Brasil: uma revisão. *Research, Society and Development*, v. 12, n. 3, p. e13412340534-e13412340534.
- Zaia, D. AM; Zaia, C. T. BV; Lichtig, J (1998). Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química nova*, v. 21, p. 787-793.