

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

**“ PROTEÍNAS DE SORO DE SANGUE BOVINO:
PROPRIEDADES NUTRITIVAS E FUNCIONAIS ”**

Dissertação de Mestrado

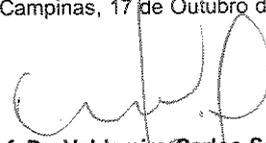
ANA SILVIA PRATA

Campinas
2002

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Ana Silvia Prata**, aprovada pela Comissão Julgadora em 17 de outubro de 2002.

Campinas, 17 de Outubro de 2002.


Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Presidente da Banca

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP P887p
V	EX
TOMBO BC/	51862
PROC.	16-837-02
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/12/02
Nº CPD	

CM00177076-2

BIB ID 272483

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Prata, Ana Silvia
P887p Proteínas de soro de sangue bovino: propriedades nutritivas e
funcionais / Ana Silvia Prata. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Sangue. 2.Proteínas. 3.*Propriedades funcionais. I.Sgarbieri,
Valdemiro Carlos. II.Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

**“ PROTEÍNAS DE SORO DE SANGUE BOVINO:
PROPRIEDADES NUTRITIVAS E FUNCIONAIS ”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em
Alimentos e Nutrição

ANA SILVIA PRATA

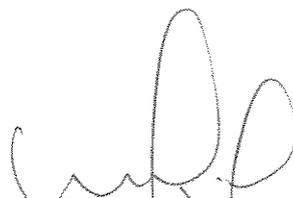
Engenheira química

Prof. Dr. VALDEMIRO CARLOS SGARBIERI

Orientador

1634

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
Instituto de Tecnologia de Alimentos
(orientador)



Prof. Dr. Flávio Schmidt
Instituto de Tecnologia de Alimentos
(membro)



Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Universidade Estadual de Campinas
(membro)

Prof. Dr. Alfredo de Almeida Vitali
Instituto de Tecnologia de Alimentos
(membro suplente)

Campinas, 17 de outubro de 2002

**Estou cansado, é claro,
Porque, a certa altura, a gente tem que estar cansado.
De que estou cansado, não sei:
De nada me serviria sabê-lo,
Pois o cansaço fica na mesma.
A ferida dói como dói
E não em função da causa que a produziu.
Sim, estou cansado,
E um pouco sorridente
De o cansaço ser só isto —
Uma vontade de sono no corpo,
Um desejo de não pensar na alma,
E por cima de tudo uma transparência lúcida
Do entendimento retrospectivo...
E a luxúria única de não ter já esperanças?
Sou inteligente; eis tudo.
Tenho visto muito e entendido muito o que tenho visto,
E há um certo prazer até no cansaço que isto nos dá
Que afinal a cabeça sempre serve para qualquer coisa.**

(Álvaro de Campos)

À minha maravilhosa família

Por tudo o que são.

Dedico com amor

à Ana Júlia que veio à vida neste momento.

Ao João, parte de minha história.

Aos amigos, Renata e Rodrigo, que sempre mantiveram-se tão próximos e nunca deixaram faltar atenção e carinho.

À todas as pessoas que me ensinaram nestes últimos anos, para citar poucos de muitos: Vitor, Claus, Bahia, Abel, “Seu João Baiano”, Carol, Flavia, Andréa.

Em especial ao Dino, à Geni e à Teresa, pelo apoio e carinho nestes intensos anos de convivência.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri pela orientação e o impressionante espírito crítico.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões apresentadas ao trabalho.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas por possibilitar a utilização das instalações e equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro, sem os quais este projeto não se realizaria.

À TECSORO Comercial Ltda pela concessão do soro de sangue bovino.

Às meninas do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada do Instituto de Tecnologia de Alimentos, pela amizade e companhia.

Ao Prof. Marcelo Morgano e Rony do Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada do Instituto de Tecnologia de Alimentos, pelas análises de minerais.

Ao Prof. Adilson do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas (CPQBA), pelas análises no Densitômetro.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	XXI
ABSTRACT	XXIII
Capítulo1. Considerações Gerais	1
1.1 <i>Introdução.....</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Estrutura do trabalho</i>	<i>3</i>
1.3 <i>Objetivos específicos</i>	<i>4</i>
1.4 <i>Referências Bibliográficas.....</i>	<i>5</i>
Capítulo2. Revisão bibliográfica	7
2.1 <i>História do fracionamento sangüíneo.....</i>	<i>7</i>
2.2 <i>Composição.....</i>	<i>8</i>
2.3 <i>Processamento do soro: cuidados adotados.....</i>	<i>14</i>
2.4 <i>Métodos de obtenção das frações protéicas</i>	<i>16</i>
2.4.1 <i>Método de precipitação com sal.....</i>	<i>16</i>
2.5 <i>Eletroforese.....</i>	<i>20</i>
2.6 <i>Propriedades funcionais.....</i>	<i>22</i>
2.6.1 <i>Propriedades funcionais tecnológicas.....</i>	<i>22</i>
2.7 <i>Planejamento experimental e Metodologia de superfície de resposta (MSR). 29</i>	<i>29</i>
2.8 <i>Referências bibliográficas</i>	<i>32</i>
Capítulo3. Obtenção e caracterização química das frações albumina (BSA) e globulina (GB).....	39
3.1 <i>Introdução.....</i>	<i>40</i>
3.2 <i>Materiais e Métodos</i>	<i>41</i>
3.2.1 <i>Obtenção e Preparo da Matéria-Prima.....</i>	<i>41</i>
3.2.2 <i>Curva de Salting out</i>	<i>41</i>
3.2.3 <i>Isolamento das Frações Protéicas.....</i>	<i>42</i>
3.2.4 <i>Método de Secagem</i>	<i>43</i>
3.2.5 <i>Caracterização química.....</i>	<i>45</i>
Composição centesimal	45

Composição em aminoácidos.....	46
Escore de aminoácidos essenciais (EAE) e digestibilidade in vitro corrigida pelo EAE (PDCAAS)	47
Determinação de minerais.....	48
Eletroforese	49
Densitometria	49
3.3 <i>Resultados e Discussão</i>	49
3.3.1 Recuperação da proteína.....	49
3.3.2 Porcentagem de recuperação das proteínas.....	50
3.3.3 Caracterização química.....	53
3.3.4 Análise de minerais	59
3.4 <i>Conclusões</i>	61
3.5 <i>Referências bibliográficas</i>	62
Capítulo4. Propriedade hidrofílica- solubilidade das frações protéicas albumina (BSA) e globulina (GB).....	67
4.1 <i>Introdução</i>	68
4.2 <i>Materiais e Métodos</i>	69
4.2.1 Materiais	69
4.2.2 Solubilidade	69
4.3 <i>Resultados</i>	70
4.4 <i>Conclusões</i>	82
4.5 <i>Referências Bibliográficas</i>	82
Capítulo5. Propriedades de superfície: espuma e emulsão das frações albumina (BSA) e globulina (GB).....	85
5.1 <i>Introdução</i>	86
5.2 <i>Materiais e Métodos</i>	86
5.2.1 Materiais	86
5.2.2 Capacidade de formação de espuma e estabilidade da espuma	87
5.2.3 Propriedades de emulsificação	88
5.3 <i>Resultados</i>	90
5.3.1 Propriedades espumantes.....	91

5.3.2	Propriedades de emulsificação.....	105
5.3.3	Estudo comparativo da estabilidade da emulsão.....	115
5.4	<i>Conclusões</i>	118
5.5	<i>Referências bibliográficas</i>	119
Capítulo6. Análise comparativa da solubilidade e capacidade emulsificante entre BSA e resíduo da secagem em spray através superfície de resposta.....		123
6.1	<i>Materiais e Métodos</i>	124
6.1.1	Materiais utilizados	124
6.1.2	Métodos	124
6.2	<i>Resultados e Discussões</i>	127
6.2.1	Interação dos parâmetros na solubilidade.....	127
6.2.2	Interação dos parâmetros na capacidade de formação de emulsão	143
6.3	<i>Conclusões</i>	151
6.4	<i>Referências Bibliográficas</i>	153
Capítulo7. Considerações finais		154
7.1	<i>Conclusões</i>	154
7.2	<i>Sugestões para trabalhos futuros</i>	155
7.2.1	Planejamento fatorial completo para a solubilidade.....	157
7.2.2	Planejamento fatorial completo para a capacidade de formação de emulsão	160

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comportamento típico de solubilidade de uma proteína em função do grau de saturação da solução com sal.	17
Figura 3. Representação dos processos básicos de desestabilização de emulsões.	26
Figura 4. Fluxograma do processo de separação das frações protéicas do soro sangüíneo. .	43
Figura 5. Frações protéicas obtidas a partir do soro de sangue bovino. Da esq para dir: Soro integral bovino liofilizado, GB liofilizada e BSA liofilizada e desidratada em <i>spray dryer</i>	44
Figura 6. Porcentagem de proteína precipitada em cada saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50
Figura 7. Eletroforese em gel SDS, Tris HCl, pH 6,8.	51
Figura 8. Curva de solubilidade de solução a 1% de GB com a variação da concentração de sal, em função do pH.	71
Figura 9. Curva de solubilidade de solução 1% de BSA com variação do pH e da concentração de sal.	71
Figura 10. Solubilidade da GB em solução 0,1M de NaCl, com variação da temperatura e pH.	75
Figura 11. Solubilidade da BSA em solução 0,1M de NaCl, com a variação de temperatura e pH.	75
Figura 12. Curva de solubilidade do soro sangüíneo e das frações BSA e GB com variação de pH sem adição de NaCl.	79
Figura 13. Curva de solubilidade de 1% de GBs liofilizadas e secas em <i>spray dryer</i> com a variação da concentração de sal e pH.	81
Figura 14. Formação de espuma das frações protéicas de sangue bovino e da BSA da clara de ovo (PCO) com variação da concentração de proteína.	93
Figura 15. Estabilidade da espuma formada pela BSA, GB e PCO após 30 minutos, variando-se a concentração de proteína.	95
Figura 16. Estabilidade da espuma formada pela BSA, GB e PCO após 60 minutos, variando-se a concentração de proteína.	97
Figura 17. Formação de espuma das frações protéicas do soro sangüíneo com variação do pH.	99

Figura 18. Cinética de drenagem das espumas das frações protéicas.....	100
Figura 19 Capacidade de formação de espuma com 1% de proteína liofilizada e desidratada em spray dryer.	101
Figura 20. Estabilidade das espumas da BSA em diferentes tempos e pHs..	103
Figura 21. Capacidade emulsificante da BSA de soro sangüíneo (BSA) em função do pH e da concentração de NaCl.....	105
Figura 22.Capacidade emulsificante da GB de soro sangüíneo em função do pH e da concentração de NaCl.	107
Figura 23. Capacidade de formação de emulsão das frações de proteínas do sangue em comparação com o concentrado protéico de soro doce, dissolvidos em água, em função do pH.	109
Figura 24.Capacidade de emulsificação da BSA seca por liofilização e por <i>spray dryer</i> , em diferentes pHs.....	113
Figura 25.Capacidade de formação de emulsão da GB seca em spray e liofilizada em função do pH e com ajuste da solução salina em 0,1M.....	115
Figura 26. Valores experimentais obtidos para a solubilidade do resíduo e da BSA seca em spray.....	127
Figura 27. Superfície de resposta e curva de contorno da solubilidade da BSA seca em spray em função da concentração de sal (0 a 0,16M) e do pH (2,58 a 7,42).....	133
Figura 28. Superfície de resposta e curva de contorno da solubilidade do resíduo da BSA seca em spray em função da concentração de sal (0 a 0,16M) e do pH (2,58 a 7,42).....	135
Figura 29. Superfície de resposta e curva de contorno da solubilidade da BSA seca em spray em função da temperatura (23 a 45°C) e do pH (2,58 a 7,42).	137
Figura 30. Superfície de resposta e curva de contorno da solubilidade do resíduo da BSA seca em spray em função da temperatura (23 a 45°C) e do pH (2,58 a 7,42).	139
Figura 31. Superfície de resposta e curva de contorno da solubilidade da BSA seca em spray em função da concentração de sal (0 a 0,16M) e da temperatura (23 a 45°C).....	141
Figura 32. Superfície de resposta e curva de contorno da solubilidade do resíduo da BSA seca em spray em função da concentração de sal (0 a 0,16M) e da temperatura (23 a 45°C).	143
Figura 33. Valores experimentais dos ensaios de capacidade emulsificante da BSA (CE) e seu resíduo (RES).	145

Figura 34. Superfície de resposta e curva de contorno da capacidade de emulsificação da BSA seca em spray.	149
Figura 35. Superfície de resposta e curva de contorno da capacidade de emulsificação do resíduo da BSA seca em spray.	151
Figura 36. Valores observados e previstos para a BSA.	158
Figura 37. Valores observados e previstos para o resíduo.	158
Figura 38. Valores previstos e observados para a capacidade de emulsificação da BSA.	162
Figura 39. Valores previstos e observados para a capacidade de emulsificação do resíduo da BSA.	162

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de aminoácidos essenciais para frações de proteína do sangue bovino (g/100gP).....	12
Tabela 2. Análise de variância	30
Tabela 3. Porcentagem de proteínas precipitadas com diferentes saturações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e seus pesos moleculares.	52
Tabela 4. Composição centesimal das frações e do soro de sangue liofilizadas.....	54
Tabela 5. Composição centesimal das frações do soro de sangue liofilizadas e secas em <i>spray</i>	54
Tabela 6. Composição de aminoácidos das frações protéicas do soro de sangue bovino e do soro integral liofilizadas.....	56
Tabela 7. Composição de aminoácidos da fração albumina do soro de sangue bovino desidratadas por dois métodos diferentes.....	58
Tabela 8. Composição em minerais das frações protéicas do soro de sangue bovino e do soro integral.....	59
Tabela 9. Digestibilidade <i>in vitro</i> das frações protéicas (BSA e GB) em comparação com a caseína comercial.....	60
Tabela 10. Drenagem de líquido das espumas protéicas com variação da concentração de amostra.....	101
Tabela 11. Propriedades emulsificantes da albumina, globulina e concentrado de soro doce.	112
Tabela 12. Estabilidade das emulsões das proteínas liofilizadas.	117
Tabela 13. Planejamento fatorial completo (2^3) para solubilidade com três variáveis e cinco níveis.	125
Tabela 14. Planejamento fatorial completo (2^2) para a capacidade de formação de emulsão com duas variáveis e cinco níveis.....	125
Tabela 15. Efeitos significativos das variáveis sobre a solubilidade da BSA.....	129

Tabela 16. Efeitos significativos das variáveis sobre a solubilidade do resíduo da BSA..	129
Tabela 17. Efeitos significativos das variáveis sobre a emulsificação da BSA.	145
Tabela 18. Efeitos significativos das variáveis sobre a emulsificação do resíduo da BSA.	147
Tabela 19. Planejamento fatorial completo para a solubilidade da BSA em função do pH, da concentração salina e da temperatura.	157
Tabela 20. Anova para o planejamento fatorial completo da solubilidade da BSA.....	159
Tabela 21. Anova para o planejamento fatorial completo da solubilidade do resíduo da BSA.....	159
Tabela 22. Planejamento fatorial completo para a capacidade de formação de emulsão da BSA em função do pH e concentração salina.	160
Tabela 23. Anova para o planejamento fatorial completo da Capacidade de emulsificação da BSA.	161
Tabela 24. Anova para o planejamento fatorial completo da capacidade de emulsificação do resíduo da BSA.....	161

RESUMO GERAL

Há um interesse constante pela utilização do sangue gerado por abates em frigoríficos tanto pela solução do problema ambiental causado pelo descarte deste sem prévio tratamento, quanto recuperação e aproveitamento das proteínas constituintes deste tecido, que possuem altíssimo valor biológico e funcional. Este trabalho propôs-se a testar o método de saturação com sulfato de amônio na recuperação das duas principais frações protéicas do sangue, a partir do soro sangüíneo. As albuminas (BSA) e globulinas (GB) isoladas foram desidratadas por dois métodos de secagem e caracterizadas quanto sua composição química, solubilidade, propriedades espumantes e emulsificantes. Sua qualidade nutricional foi avaliada através da digestibilidade *in vitro* e da composição de aminoácidos e minerais. O método utilizado, apesar de seletivo, separa frações com características físico-químicas semelhantes e, portanto a utilização das frações para fins farmacêuticos exige um posterior passo de purificação. As duas frações obtidas são compostas de aproximadamente 85% de proteínas, limitadas em 30% de triptofano (BSA) e 12% em isoleucina (GB), e com digestibilidades idênticas (91 e 98%) ($p < 0,05$) à da caseína (90%). As frações apresentaram excelentes propriedades funcionais, sendo que a BSA mostrou-se bem mais solúvel que a GB, não tendo sofrido influência da variação do pH. Sua capacidade de formação de espuma (CFE) comparou-se à da proteína da clara de ovo, sendo superior em pequenas concentrações de proteína. A BSA, apesar de mesma CFE, forma uma espuma menos estável que a GB. As diferenças encontradas nos métodos de secagem são relevantes, tendo a secagem em spray melhorado as propriedades funcionais estudadas das duas frações protéicas, exceto a CFE da GB, e não interferido na composição química (centesimal e de aminoácidos). Portanto num escalonamento de produção de proteínas a partir do sangue bovino, seguramente poder-se-ia fazer uso da secagem em spray dryer, por ser mais rápida e mais barata. No entanto, através de um planejamento experimental, comparou-se o resíduo

de secagem da BSA para saber se a fração do produto mantido nas condições do spray por um tempo prolongado teria suas características funcionais modificadas. Esse indicador de desnaturação foi observado, revelando que as condições de secagem em spray devem ser controladas. Mesmo assim, a BSA na forma de resíduo apresentou boa solubilidade e propriedade emulsificante, mas certamente isto se deve à sua estrutura compacta e com muitas pontes dissulfeto.

PALAVRAS CHAVE: BSA, propriedades funcionais, precipitação

ABSTRACT

It has been a constant interest in the utilization of animal blood from slaughter houses not only because of the intrinsic value of their constituents, mainly the proteins, but also to solve environmental problems. In this research the two main bovine protein fractions, the albumin (BSA) and globulin (GB) were isolated by using respectively 50% and 80% saturation with ammonium sulphate. The isolated fractions were dehydrated by two methods of drying (freeze drying and spray drying) Chemical composition and technological properties (solubility, foaming, emulsifying capacity and stability) were studied in the dehydrated powders. Protein content of two fractions was respectively, BSA 83%, GB 84-85%. BSA was 30% limited in tryptophan and GB 12% in isoleucine and protein digestibility was above 95% for both fractions. Both fractions presented excellent protein solubility. BSA was less sensitive to changes in pH than GB. Foaming capacity was very high in both fractions (equal or better than egg white). The influence of the drying methods was relevant. The drying method did not influence significantly the composition and the functional properties studied, except for the emulsifying capacity of GB that was decreased in the spray dried sample. The data suggested that for industrial operation the spray drying could perfectly replace the freeze-drying method. A factorial planned experiment was performed to compare the fractions that come out naturally from the spray drying with the portion that remains inside the equipment during the entire drying period. It was demonstrated that the retained sample (called BSA residue) was significantly affected by prolonged heat treatment. Even though the solubility and emulsifying properties of this sample remained high but significantly inferior BSA that was collected naturally out of the spray drying. The nutritional index estimated (PDCAAS) ranged from 80% for lyophilized BSA to 91% for the spray dried GB, compared to 86% for casein.

KEYWORDS: BSA, functional properties, precipitation

Capítulo 1. Considerações Gerais

1.1 Introdução

O problema da desnutrição não é um fato isolado que se refere apenas a países subdesenvolvidos, ele está associado em geral a níveis sociais mais baixos onde o acesso à diversidade de alimentos é limitado.

O sangue animal contém em torno de 18% de proteína, semelhante à carne, e suas proteínas, apresentam elevado valor nutritivo e excepcionais propriedades funcionais, porém seu uso é limitado devido o conceito asséptico do consumidor (GÓMEZ-JUÁREZ *et al.*, 1999). Os abates, no Brasil, em 1997, chegaram a 194.180 toneladas, ano em que houve uma queda no número de abates (ANUÁRIO PECUÁRIO 98/99). A produção de sangue anualmente nos abatedouros fica ao redor de 150 milhões de litros de sangue, que até o momento é mal aproveitado, sendo usado, apenas em parte, em rações para animais ou fertilizantes (PENTEADO *et al.*, 1979). Considerando que a média dos pesos dos animais seja 750 Kg, sendo 10% a fração pertinente às proteínas do sangue, no melhor processo de sangria apenas 50% do sangue é recuperado, deixando-se de utilizar o equivalente à 38Kg de proteínas para cada bovino abatido (RENUNCIO & HAMAD, 1999). Além disso, o sangue dos abates é descartado em esgotos e rios,

direto dos matadouros, sem prévio tratamento implicando num importante fator de poluição.

Uma solução encontrada para minimizar o problema da poluição causada pelo sangue e evitar o desperdício de proteínas é o desenvolvimento de alimentos e o incentivo à pesquisa para a utilização de fontes alternativas de proteínas.

As proteínas do sangue vêm sendo incorporadas a alimentos no intuito de melhorar as propriedades emulsificantes, de retenção de água e as propriedades texturais de produtos cárneos, panificados e de confeitaria (TYBOR *et al.*, 1975; WISMER-PEDERSEN, 1988; EL-SAYED *et al.*, 1998) e o fato de possuírem baixa quantidade de fibras permite uma digestibilidade maior evitando problemas digestivos. O seu alto valor protéico faz com que produtos formulados com proteína de sangue sejam competitivos com outros produtos existentes no mercado. As possibilidades do uso em produtos comerciais a partir desta proteína são diversas: alimentos enriquecidos, alimentos de consumo popular (leite em pó como substituto da caseína, carne, queijo), usos medicinais e aplicações bioquímicas (transportador de ferro em anemias, substituto da caseína em medicamentos, reagentes finos (albumina, heparina, frações...), meio de cultura e usos diversos (plásticos de caseína, fração vermelha como corante em alimentos, pintura a óleo) (LARA *et al.*, 1977)).

Existe um interesse particular na BSA pelo fato de possuir em sua estrutura além de todos os aminoácidos essenciais, 17 pontes dissulfeto que lhe conferem estabilidade e propriedades funcionais fisiológicas. Alguns autores (BOUNOUS *et al.*, 1989) atribuem o estímulo da resposta imune ao aumento da síntese de glutathione celular. A glutathione é um polipeptídeo composto por resíduos de ácido glutâmico e cisteína e, portanto o aumento de compostos sulfurados provoca um aumento na produção deste polipeptídeo.

Sendo assim, o projeto visa a utilização do soro de sangue bovino como matéria-prima para obtenção de frações protéicas com propriedades funcionais

tecnológicas e/ou fisiológicas diferenciadas que propiciem uma melhora substancial de propriedades nutritivas e funcionais tecnológicas quando adicionados a alimentos de uso tradicional (farinhas, produtos cárneos, emulsões graxas, etc.). Por outro lado, alguns desses ingredientes poderão servir de base para a formulação de produtos especiais que visam melhorar o estado de saúde e prevenir doenças em grupos específicos da população como idosos, crianças severamente desnutridas, crianças nascidas prematuras, pessoas com deficiências imunológicas.

1.2 Estrutura do trabalho

O trabalho encontra-se dividido em 6 capítulos, e no presente é feita uma breve introdução sobre as vantagens de se utilizar as proteínas do soro de sangue bovino na manufatura de um produto alimentício. Em seguida, estão apresentados os objetivos específicos, que definem a estrutura do trabalho. Os demais capítulos são constituídos cada um de Introdução, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões.

O capítulo 2 é desenvolvido uma revisão sobre os assuntos abordados no trabalho, como proteínas do soro sanguíneo, métodos de separação e propriedades funcionais. Este capítulo busca revisar alguns conceitos assim como comparar trabalhos que vêm sendo propostos nos últimos anos.

O capítulo 3 refere-se ao processo de obtenção das frações protéicas do soro sanguíneo pelo método que apresentou maiores vantagens ao que se pretendia o trabalho, não se preocupando com o grau de pureza das proteínas obtidas. A caracterização química usualmente adotada em alimentos consiste de composição centesimal e de aminoácidos. As propriedades nutritivas foram feitas *in vitro*, e a disponibilidade protéica foi feita baseada num índice de correção do aminoácido limitante.

Os capítulos 4 e 5 tratam das propriedades ditas funcionais tecnológicas das proteínas, ou seja, propriedades que interferem na textura, consistência ou nas principais qualidades de um produto alimentício. Nestes capítulos investiga-se a influência de muitas variáveis, inclusive o processo de secagem, nas propriedades de superfície e hidrofílicas das proteínas.

No capítulo 6, foi feito um planejamento de experimentos para comparar as propriedades funcionais tecnológicas da BSA desidratada em spray que foi recolhida ao final do tempo e em condições programadas com o resíduo que permaneceu na câmara de secagem até o final de todo o processo, e que provavelmente esteve em contato com temperaturas mais elevadas por um tempo muito mais longo. As características químicas desta nova amostra foram citadas e comparadas também no capítulo 3. O capítulo 7 apresenta as conclusões gerais, recomendações sobre o trabalho desenvolvido e algumas sugestões para o trabalho futuro.

As nomenclaturas foram esclarecidas apenas nos títulos e na introdução geral, e segue que BSA e a GB referem-se não à proteínas purificadas e sim a um pool de proteínas obtidas por um primeiro processo de purificação e concentração onde a grande maioria compreende albuminas e globulinas, respectivamente.

1.3 Objetivos específicos

- obtenção das frações BSA e GB do soro de sangue bovino;
- caracterização química das duas frações protéicas obtidas do soro (composição centesimal e de aminoácidos);
- propriedades funcionais tecnológicas (solubilidade, poder emulsificante e espumante) dos concentrados protéicos, BSA e GB;
- efeito das diferentes técnicas de secagem nas propriedades tecnológicas das frações BSA e GB

1.4 Referências Bibliográficas

ANUÁRIO PECUARIO 98/99, GPPAA: Gabinete de Planejamento e Política Agro alimentar; Ed. Eurostandarte, 1999, p.383.

BOUNOUS, G., BATIST, G., GOLD, P. Immunoenhancing property of dietary whey protein in nices: rele of glutathione. *Clinical and Investigative Medicicine*, Ottawa,v. 12, p, 154-161, 1989.

EL-SAYED, M.M., ABDEL HAMID, F.F., AHMED, Y.M., ALI, S.H., MANSOUR, O.Y., ABDALLAH, N.M. Biochemical studies on proteins from cheese whey and blood plasma by-products. *Nahrung, Weinheim* v. 42, n. 1, p. 12-15, 1998.

GÓMEZ-JUÁREZ, C.; CASTELLANOS, R.; PONCE-NOYOLA,T.; CALDERÓN, V.; FIGUEROA, J. Protein recovery from slaughterhouse wastes, *Bioresource Technology*, Amsterdam, v.70, n.2, p.129-133, 1999.

LARA, F. O., RAMÍREZ, F., SANCHEZ, N. Estudo para obtencion de proteínas de sangue bovino. **Tecnologia de Alimentos**, v.12, jul-out, p.141-144, 1977.

PENTEADO, M.V.C., LAJOLO, M.F., SANTOS, N.P. Functional and Nutritional Properties of Isolated Bovine Blood Proteins. **Journal of Science Food Agriculture**, London, v.30, n.2, p.809-815, 1979.

RENUNCIO, A., HAMAD, A.J.S. Valorização do sangue coletado em pequenos abatedouros para consumo humano. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, jun, 1999.

TYBOR, P.T., DILL, C. W., LANDMAN, W.A. Functional properties of protein isolated from bovine blood by a continuous pilot process. **Journal of Food Science**, Chicago, v.40, n.1, p.155-159, 1975.

WISMER-PEDERSEN, J. Use a haemoglobin in foods - A Review. **Meat Science**, Barking, v.24, n.1, p.31-45, 1988.

Capítulo2. Revisão bibliográfica

2.1 História do fracionamento sangüíneo

Desde o século XVII, as transfusões de sangue têm sido uma tentativa de remediar as perdas de sangue causadas por traumas, partos, hemorragias e cirurgias. Antes da identificação dos anticorpos isoaglutinantes (fator Rh), as transfusões provocaram muitas mortes. A disponibilidade do sangue para a transfusão sempre foi um problema e a dificuldade era maior ainda durante as guerras: períodos onde a pesquisa de químicos em busca de um substituto sintético para o sangue foi intensa (REVISTA, 2002).

O fracionamento das proteínas do sangue teve início nos Estados Unidos antes da II Guerra Mundial (BUGOS, 1989). Os primeiros substitutos surgiram durante a Segunda Guerra: os alemães utilizavam soluções aquosas de PVP (polivinilpirrolidona). O objetivo era apenas o de manter o volume sangüíneo, uma vez que esta solução não era capaz de transportar oxigênio e gás carbônico. Durante a guerra do Vietnã, várias tentativas foram feitas, utilizando soluções aquosas de hemoglobina ou derivados. Embora mais eficaz do que o PVP, os efeitos colaterais incluíam complicações renais sérias, que muitas vezes levavam à morte (REVISTA, 2002).

Em 1937, Dr. Edwin J. Cohn, professor em Harvard, mobilizou seu laboratório para isolar uma fração transfusível do sangue, a BSA. Estudaram em seus anos de experiência os efeitos de solventes, pH, força iônica, temperatura e concentração de proteína na solubilidade, para projetar um novo método para separação do plasma em seus constituintes. Cohn adotou uma técnica que empregava etanol a frio para a separação das proteínas do plasma. As células eram removidas por centrifugação e a remoção deste era feita em liofilizadores podendo a recuperação ser escalonada para produção industrial. Em 1941, foi construída uma planta piloto em Harvard para produzir BSA em grande escala (CREAGER, 1999).

A BSA foi idêntica quimicamente a HSA (soro albumina humana) em termos de solubilidade, ponto isoelétrico, carga elétrica, mobilidade eletroforética e sedimentação em ultracentrifuga. Apenas técnicas imunológicas puderam distingui-las. Infelizmente, as diferenças residuais entre as proteínas do sangue humano e bovino eram insuperáveis: irritantes antigênicos na albumina de soro bovino não puderam ser purificados bioquimicamente, condenando a utilização médica da proteína bovina para feridos de guerra. (CREAGER, 1998). O maior avanço no estudo e fracionamento de proteínas do sangue ocorreu durante fases difíceis da história, por necessidade. O objetivo de desenvolver e melhorar tais técnicas não deve se perder, para que outros avanços possam ocorrer, afinal o sangue é o meio de propagação da vida e de doenças.

2.2 Composição

O sangue é um tecido de grande complexidade, formado por elementos, eritrócitos, linfócitos, granulócitos e plaquetas; de proteínas plasmáticas, soro albuminas de mais de um tipo, com grupo sulfidril e sem, globulinas diversas, algumas euglobulinas, algumas pseudoglobulinas, algumas lipoproteínas, glicoproteínas ou mucoproteínas, proteínas envolvidas com a coagulação sangüínea, combinada com metal; os hormônios que, por definição, são os

mensageiros químicos mas que têm muito raramente, sido separados do sangue e caracterizados em seu estado natural; diversos anticorpos e componentes complementos envolvidos com a imunidade, e apesar de toda esta complexidade não há obstáculo teórico para isolar os constituintes protéicos de qualquer tecido ou para o estudo de suas interações com componentes biológicos (COHN et al., 1950).

A manutenção da fluidez do sangue deve-se basicamente a anticoagulantes naturais (heparina, antitrombina 3) e o processo de formação de um coágulo, compreende em essência, em uma série de transformações proenzimas em enzimas ativadas, culminado na formação da enzima trombina, que converte o fibrinogênio solúvel em fibrina (polímero) insolúvel.

O plasma é obtido pela adição de um agente anticoagulante ao sangue integral e que através da centrifugação retira-se as células vermelhas. O soro bovino é a parte líquida do sangue quando este, em condições normais, forma a rede de fibrina (coágulo). Portanto, o soro apresenta a mesma composição do plasma diferindo apenas pelo fato de não ter o fibrinogênio e no lugar da protrombina (inativa) possuir a trombina (ativa).

O plasma possui 92% de água e 8% de sólidos sendo que 6,5% são proteínas (3,3% albumina, corresponde a 50% da fração protéica do plasma) e 1,5% são sais, açúcares, etc. (AVERY, 1972). O concentrado de plasma, com 7% de umidade possui cerca de 72% de proteína sendo 42,8% albumina, 53% globulina e 5% fibrinogênio (SGARBIERI, 1996), representando uma fonte potencial de proteínas dietéticas de alta qualidade.

A BSA é uma proteína globular (66 kDa) com 580 resíduos de aminoácidos e 17 pontes dissulfeto entre as cadeias e 1 grupo livre de tiol no resíduo 34, sendo que constitui mais da metade das proteínas séricas (~60%). Ela é sintetizada no fígado e no corpo humano adulto está em torno de 350g. O nível normal de albumina varia de 3 a 5 g por 100 mL de plasma (TANAKA, 1987). A estrutura secundária contém regiões helicoidais, 54% de α -hélice e 40% de estrutura

β (BOYE et al., 1996), “ β -sheets” e “ β -turns” e é responsável pela conformação da molécula; já a estrutura terciária e a quaternária afetam a atividade biológica da proteína assim como seu valor nutricional e sua funcionalidade como um componente alimentar (SIKORSKI, 1997).

Os loops helicoidais dobram-se para formar bolsões hidrofóbicos que ligam e transportam várias substâncias importantes como ácidos graxos, bilirubina e muitas outras drogas (ROUHANA *et al.*, 1997), sendo a principal responsável pela manutenção da pressão osmótica do sangue. A complexação dá-se normalmente por ligações não covalentes e freqüentemente é reversível e não específica (SGARBIERI, 1996).

Devido suas pontes dissulfeto, possui diversas propriedades tecnológicas como hidrofobicidade que está ligada diretamente com a propriedade espumante e boa capacidade de geleificação, além de se tornar uma molécula bastante estável e solúvel em solução aquosa. São essas pontes que organizam as moléculas em seus domínios e é exatamente no terceiro domínio que os ácidos graxos se ligam e com isso estabilizam a molécula de proteína, aumentando a temperatura de desnaturação da BSA. No ponto de transição térmica de desnaturação da BSA (65°C), a maioria das moléculas de BSA perde seus ácidos graxos ligados (que estabilizam a molécula termicamente) resultando em desnaturação. Pequenas quantidades retêm o ácido graxo e são estruturalmente estáveis a 78°C. O ponto isoelétrico da BSA de soro sanguíneo é 4,9 (RAEKER & JOHNSON, 1995).

Propriedades nutritivas e fisiológicas das proteínas do sangue bovino

Historicamente, o estado nutricional de populações vivendo em países industrialmente desenvolvidos pode ser mostrado pelo desbalanceamento alimentar pelo excessivo consumo de gorduras, açúcar e sal ou pela diminuição considerável da ingestão de proteínas de alto valor biológico, vitaminas, minerais e fibras. Estudos epidemiológicos têm confirmado que esta deficiência nutricional é a grande causa de doenças crônico-degenerativas, doenças tais responsáveis por

70-80% da mortalidade nos países desenvolvidos e cerca de 40% naqueles em desenvolvimento. Sendo assim, novas fronteiras se abrem ligando nutrição e medicina com o surgimento do conceito de alimentos funcionais. A nutrição continua o seu papel de fornecer nutrientes, mas a descoberta de que certos alimentos contêm componentes ativos capazes de reduzir o risco de doenças, inclusive o câncer, altera a visão de alimento comum.

Quando comparado com as necessidades mínimas indicadas pela FAO/WHO (1990), todos os aminoácidos essenciais presentes no soro de sangue superam o perfil recomendado tanto para crianças (2 - 5 anos) como para adultos. Além disso, as proteínas de soro sangüíneo possuem altos níveis de aminoácidos com funções específicas como leucina, valina e lisina, cuja importância para a nutrição humana é muito grande. O perfil de aminoácidos é importante na avaliação da qualidade nutritiva da proteína, enquanto que a digestibilidade é um determinante primário da biodisponibilidade desses aminoácidos (FAO/WHO,1990).

PENTEADO *et al.*(1979) determinaram a composição em aminoácidos essenciais das frações protéicas do sangue bovino, que é mostrada na Tabela 1, comparativamente ao padrão estabelecido pela FAO/WHO.

Tabela 1. Composição de aminoácidos essenciais para frações de proteína do sangue bovino (g/100gP).

Aminoácido	BSA	GB	Globina	FAO/WHO
Lys	8,80	5,78	7,47	5,80
His	2,26	2,13	5,33	1,90
Thr	3,98	6,66	3,73	3,40
Val	6,13	8,00	10,10	3,50
½ Cys + Met	4,42	5,36	1,30	2,50
Ileu	2,02	2,62	0,50	2,80
Leu	9,28	6,93	11,18	6,60
Tyr + Phe	8,98	15,89	7,49	6,30

Fonte: Adaptado de Penteadó, *et. al.*, 1979.

WISMER-PEDERSEN (1979) concluiu que em virtude de suas limitações em isoleucina e metionina, o sangue deve ser utilizado juntamente com proteínas que suplementem estes aminoácidos. Segundo o autor, a mistura usada em emulsões (47% de sangue e 53% de caseinato) apresenta um índice químico de 94,0 em relação ao padrão da FAO, sendo a metionina o primeiro aminoácido limitante.

Uma das vantagens do uso da BSA, além de suas propriedades funcionais tecnológicas e nutritivas, é seu provável efeito sobre o sistema imunológico. Segundo SMITHERS *et. al.* (1996), o mercado de alimentos funcionais fisiológicos está crescendo rapidamente, principalmente em países da Ásia e América do Norte. Tanto os consumidores quanto a indústria estão interessados em alimentos que ofereçam benefícios à saúde, pois os custos de cuidados com saúde relacionadas à doenças associadas à dieta, estão crescendo.

PETERS *et al.* (1977) mediram as propriedades antigênicas de 14 fragmentos de BSA obtidos pela clivagem com pepsina, tripsina e brometo de cianogênio. Técnicas de precipitina, ligação e blocagem foram empregadas

usando antisoro de coelho contra a BSA e dois de seus fragmentos, o terminal –COOH e o terminal –NH₂. Todos os sete fragmentos maiores que 21000 Da formaram precipitados imunes, porém estes precipitados não foram formados com fragmentos menores, apesar destes possuírem os sítios antigênicos. O comportamento antigênico da BSA e seus fragmentos evidenciam uma grande distribuição de múltiplos sítios antigênicos. Alguns sítios são típicos em sua reatividade seletiva com populações distintas de anticorpos. Outros mostram a propriedade não-usual de reatividade com populações comuns de anticorpos, refletindo homologia na composição estrutural da BSA em localizações distantes.

De acordo com BRINK (1996), as proteínas do soro de leite possuem a capacidade de aumentar a resposta imune, elevar os níveis de glutathione celular e aumentar a longevidade. Sabe-se que a albumina de soro (BSA) é a mesma para o sangue e para o leite, e que esta seria uma das maiores responsáveis pelo aumento nos níveis de glutathione. A glutathione é um tripeptídeo composto por cisteína, ácido glutâmico e glicina e atua no organismo como um potente agente antioxidante e desintoxicante e que evita a formação de peróxido de hidrogênio, neutraliza a ação de metais tóxicos como o ferro e alumínio, carcinógenos químicos e a peroxidação de lipídios nas membranas das células. A glutathione protege contra alterações no DNA causadas por raios X e luz ultravioleta, ajudando ainda a manter a capacidade carreadora de oxigênio das células vermelhas do sangue.

Os cientistas acreditam que esta capacidade em aumentar a resposta imune e os níveis de glutathione, sugerida para a BSA do soro sanguíneo depende grandemente dos peptídeos de glutamincistina formados no processo de digestão da BSA. É muito importante preservar esses peptídeos para manter a integridade da proteína e a sua funcionalidade. Se essas ligações forem rompidas, as proteínas ficam mais expostas às enzimas digestivas que poderão destruir sua integridade, eliminando suas propriedades fisiológicas (BRINK, 1996).

Certamente, após a descoberta da importância de certas proteínas presentes no soro de sangue, que possuem propriedades fisiológico/funcionais especiais, se faz necessária a expansão de sua aplicação dentro da área de alimentos funcionais fisiológicos e do desenvolvimento de novas técnicas, para sua produção, mantendo as características estruturais e conformacionais de cada proteína, por que disto parece depender sua atividade biológica.

2.3 Processamento do soro: cuidados adotados

Durante toda seqüência de operações do processamento do sangue para obtenção de soro e plasma, isto é, desde a coleta até sua utilização, torna-se necessário a manutenção da higiene e cuidados sanitários, que podem ser encontrados no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RISPOA).

O método de coleta é um dos fatores que determinam o grau de contaminação além do rendimento de obtenção do sangue. A coleta em recipientes abertos não deve ser utilizada quando o sangue se destina a uso humano, pois propicia um alto grau de contaminação bacteriana proveniente tanto da pele do animal durante as convulsões pós-sangrias como da urina e do conteúdo do rumem quando o esôfago é atingido durante a degola. Porém é possível a obtenção do sangue com baixas contagens microbianas se, tanto o local da sangria na carcaça quanto o equipamento forem desinfetados antes da coleta.

Segundo AKERS (1973), a coleta higiênica pode ser feita usando-se uma faca côncava e oca acoplada à uma mangueira flexível que transporta o sangue diretamente para recipientes fechados. A remoção das células vermelhas, geralmente é feita através de centrifugação por fluxo contínuo ou pratos. Todas as superfícies que entram em contato com o sangue devem ser lisas, e as válvulas e bombas devem ser projetadas de modo a minimizarem o problema de ruptura das células sangüíneas, o que provocaria o aparecimento de aroma e sabor

indesejáveis. Além disso a forma e velocidade de rotação tem importância crítica na separação. O rotor utilizado usualmente é cônico e a velocidade varia em torno de 6000g (ALENCAR, 1983).

As frações podem ser desidratadas por vários métodos como a secagem em rolos (*drum dryer*), pulverizadores (*spray dryer*) ou liofilizadores (*freeze dryer*).

No *spray dryer*, o material é introduzido numa câmara de secagem através de pulverizadores (orifícios com alta pressão) ou disco de rotação perfurado e sob alta velocidade. As gotículas úmidas do material aspergido são mantidas em contato com um fluxo de ar aquecido por um período curto de tempo que varia de 1 a 10 segundos, por isso as perdas nutricionais do alimento são mínimas. No processo de liofilização, há uma inter-relação entre a temperatura do produto e da prateleira, a pressão da câmara e o tempo. É baseado na sublimação do gelo através da diminuição da pressão dentro da câmara. Apesar de manter a estrutura das proteínas intactas, pois se trabalha com baixas temperaturas e pressões, é um método muito caro para ser usado na produção de plasma para fins alimentícios sendo mais utilizado para a produção de produtos farmacêuticos.

ERIKSSON & VON BOCKELMANN (1975), recomendam a ultrafiltração para concentrar o plasma de 9 a 20-25% de sólidos totais, a fim de diminuir custos e danos às proteínas. A ultrafiltração é possível, pois 75% das proteínas do plasma possuem peso molecular acima de 70000Da.

Além das indústrias alimentícias, as proteínas têm um vasto uso em indústria de tecnologia de materiais, como a caseína, na fabricação de adesivos, a gelatina tem aplicação em colas quentes para encadernação de livros e como ligante/estabilizante em emulsões fotográficas. A proteína de soja é usada como agente espessante de papel e cola para madeira (DE GRAAF, 2000; SANDER *et al.*, 1997). Uma recente aplicação é o uso de proteínas como surfactantes e cosméticos. (DE GRAAF, 2000). A vantagem de aplicações técnicas, diferentemente das alimentícias, é que a desnaturação protéica não é reconhecida

como um problema. Longe disso, é um pré-requisito para o processamento e obtenção de boa performance de proteínas em um material.

2.4 Métodos de obtenção das frações protéicas

Existem na literatura diversos métodos para separação das frações protéicas (AVERY, 1972; HALLIDAY, 1973; LARA *et al.*, 1977; GÓMEZ-JUARÉZ *et al.*, 1999; PORCELLI *et al.*, 1982; KUBOTA *et al.*, 1999). Os métodos envolvem a interação de reagentes, orgânicos ou não, na solubilidade da proteína. Quando esta interação diz respeito a sais-proteínas vale a regra citada abaixo.

2.4.1 Método de precipitação com sal

A precipitação de proteínas com sal (“salting out”) consiste em encontrar um ponto de saturação da solução de proteína pelo sal (ITO, 2000). Nesta região, o sal exerce um efeito específico na proteína que depende da natureza do sal e de sua concentração (SHIH *et al.*, 1992). COHN & EDSALL (1943) encontraram uma relação entre a solubilidade da proteína e a força iônica da solução:

$$\log S = \beta - K_s I$$

onde:

S é a solubilidade da proteína de interesse (g/kg de água),

I a força iônica (mol/kg de água),

K_s é a constante específica de sal e proteína, e

β é a constante que depende da temperatura e da proteína mas não do sal.

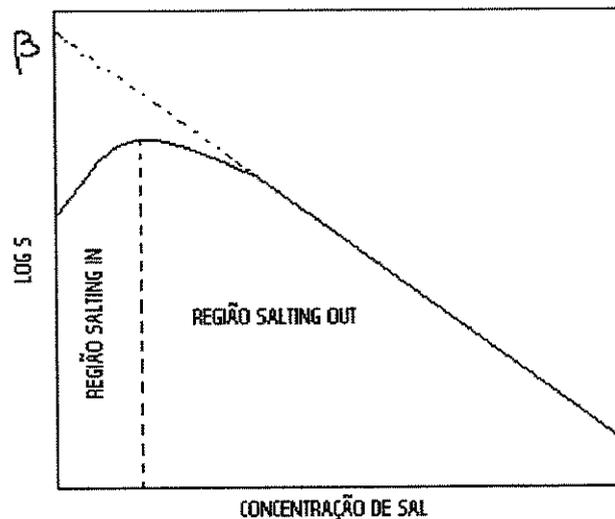


Figura 1. Comportamento típico de solubilidade de uma proteína em função do grau de saturação da solução com sal.

O processo de precipitação é muito utilizado tanto nos passos de recuperação quanto de purificação de proteínas. Ele pode ser induzido pela adição de uma variedade de agentes precipitantes, como sais inorgânicos, solventes orgânicos, polieletrólitos ou polímeros não iônicos (SHIAU & CHEN, 1997). Este processo tem ampla aplicação como procedimento de isolamento na recuperação de proteínas tanto em escala industrial como no laboratório (SHIH *et. al.*, 1992). Pela equação anterior percebe-se que o tipo de sal tem uma enorme influência no processo de separação. Resultados experimentais mostraram que ânions polivalentes em sais como sulfato de sódio e fosfato de sódio têm maiores valores de K_s , mas que cations divalentes como magnésio ou cálcio diminuem o valor desta constante. No entanto, sais com cátions univalentes e anions polivalentes como o sulfato de amônio e sódio são os mais utilizados como precipitantes (SHIH *et. al.*, 1992).

Além disso a efetividade relativa do sal em precipitação de proteínas obedece à série de Hofmeister que relata a interação entre os íons e os grupos hidrofóbicos da proteína. É a parte hidrofóbica da proteína que governa o salting-out da proteína na solução salina. O sal que possui grande efeito na série tende a ter alta constante específica (K_s) e com isso um maior efeito de diminuir a

solubilidade. A tendência de o sal causar desnaturação da proteína é inversamente relacionado com sua posição na série de Hofmeister (SHIH *et. al.*, 1992), como segue:

Citrato> Sulfato> Fosfato> Cloreto> Nitrato> Tiocianato

Isto se deve ao fato da série relacionar as interações entre os íons e os grupos hidrofóbicos da proteína. Geralmente proteínas dobram-se em soluções aquosas e o número de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos expostos é minimizado. No entanto, uma análise tridimensional da estrutura da proteína mostra que uma fração substancial desses resíduos permanece na superfície, não podendo, portanto se ignorar sua influência sobre as interações proteína-proteína (SHIH *et. al.*, 1992).

Precipitação com sulfato de amônio

Este procedimento para o fracionamento das proteínas consiste na adição sucessiva de sulfato de amônio à solução protéica e na remoção do precipitado em cada passo. A quantidade de sulfato de amônio a ser adicionada para obter a saturação desejada pode ser encontrada na literatura sob a forma de tabelas. Em uma delas encontra-se a massa de sal a ser adicionada por litro de solução (em determinada condição de temperatura) para atingir uma determinada saturação salina.

As maiores vantagens do uso do sulfato de amônio (ENGLARD & SEIFTER, 1990) são :

1. Na saturação, ele possui uma molaridade suficientemente alta que causa a precipitação da maioria das proteínas
2. Não possui alto calor de dissolução e o calor gerado, é rapidamente dissipado
3. Esta solução saturada (4,04M a 20°C) tem uma densidade (1,235g/cm³) que não interfere na sedimentação da maioria das proteínas por centrifugação

4. Esta solução concentrada previne ou limita o crescimento bacteriano
5. Protege a maioria das proteínas da desnaturação.

Tem como desvantagem a necessidade do uso de técnicas de diálise ou ultrafiltração para a retirada do sal e que, apesar de seletiva, precipita outras frações protéicas, prejudicando a pureza da amostra.

Método utilizando Polietilenoglicol (PEG) (POLSON & RUIZ-BRAVO, 1972)

Este método é utilizado para isolar alguns componentes do plasma humano em escala industrial. Ele possui curvas de solubilidades das proteínas plasmáticas sob diversas condições de pH com concentrações de PEG variando de 0 a 20 g/100mL. Por não envolver reação química é um método menos danoso às proteínas, porém o polímero também deveria ser eliminado após a separação da proteína desejada. A remoção é feita pela precipitação de sulfato de amônio ou alternativamente por métodos cromatográficos.

Portanto, o esforço com a diálise não seria eliminado e o polietilenoglicol é mais caro que o sulfato de amônio. Além disso, dependendo da fração precipitada, na eliminação do PEG (por exemplo, de peso molecular 6000Da), utiliza-se sulfato de amônio saturado a 33% e com esta concentração de sal ocorre também a precipitação de outras proteínas, o que não auxiliaria em termos de pureza de amostra.

Método de Cohn (COHN et al, 1946)

Conhecido como método 6 de Cohn, é o principal método de fracionamento de plasma nos Estados Unidos, sendo usado em escala industrial para a produção de albumina humana para uso clínico. Ele exige a variação da força iônica do solvente, pH, temperatura, concentração de etanol e de proteína plasmática. O processo é trabalhoso e criterioso, além disso, para a obtenção da fração V (albumina) é necessário fazer uma previa separação de outras quatro frações. As

frações saem com mais componentes, sendo que para obtenção da proteína com alto grau de pureza é imprescindível um processo de purificação.

Método de Schneider (SCHNEIDER et al., 1975)

A albumina neste método pode ser isolada pelo aquecimento da solução na presença de caprilato de sódio (0,004M) e depois concentrada pela precipitação com Polietilenoglicol (PEG) ou por ultrafiltração. A solução final pode ser ajustada para a concentração de proteína desejada (SCHNEIDER et al., 1976).

Tem como vantagem apenas dois passos para isolar a albumina, o baixo custo e a viabilidade de produção em grande escala, porém faz-se uso de uma temperatura alta (68°C) a qual desnatura outras proteínas senão a albumina. Seria interessante seu uso, caso a proteína desejada fosse apenas a albumina e globulinas desnaturadas.

2.5 Eletroforese

A caracterização das proteínas fracionadas pode ser feita determinando-se a pureza, o peso molecular, o tamanho e a presença de subunidades e pela análise de aminoácidos.

Métodos eletroforéticos dão algumas das mais simples e freqüentemente, mais sensíveis aproximações para determinar o número de componentes protéicos em uma amostra. São usados de acordo com a natureza e características da proteína a ser testada, seja para o fracionamento ou apenas para a caracterização da amostra (GARFIN, 1990).

As eletroforeses podem ser realizadas em sistema contínuo, pela aplicação direta da amostra no gel de separação, ou por sistema descontínuo, onde a amostra é aplicada num gel de concentração antes de ser separada em seus componentes. O gel de concentração difere do gel de separação pelo tamanho de poros e pH além de ter a função de concentrar as proteínas de forma que a

resolução não dependa do volume inicial da amostra. Os sistemas descontínuos mais amplamente usados são o de Ornstein-Davis (condições não dissociantes) e Laemmli (condições dissociantes) (GARFIN, 1990).

Sistema descontínuo de Laemmli (SDS-PAGE)

O método consiste em solubilizar microgramas da proteína em dodecilsulfato de sódio (SDS) a quente. O detergente aniônico em excesso se liga fortemente, com a maioria das proteínas, numa proporção de aproximadamente 1,4 mg de SDS/mg de proteína, resultando num complexo com carga negativa. As interações com SDS clivam todas as ligações não-covalentes da proteína, causando um desdobramento das macromoléculas. Tratamento concomitante com um agente redutor de dissulfeto (como o 2-mercaptoetanol) desnaturam a proteína, clivando-a em suas subunidades. As mobilidades eletroforéticas do complexo polipeptídico-detergente assumem a mesma relação com seus pesos moleculares, pois neste tratamento a separação depende apenas do tamanho dos polipeptídios, já que o SDS lhes confere carga uniforme. A taxa de migração dos derivados SDS para o anodo é inversamente proporcional ao logaritmo de seus pesos moleculares.

Na eletroforese parte-se do princípio de que qualquer grupo carregado migra, quando em um campo elétrico. Como as proteínas possuem carga quando em qualquer outro pH que não o seu pH isoelétrico, elas também migram para o eletrodo com cargas opostas e suas velocidades de migração são influenciadas por interações com o gel, que age como uma peneira molecular. As interações opostas de força elétrica e peneira molecular resultam numa taxa de migração diferencial para as proteínas que constituem a amostra.

O SDS – PAGE supera as limitações da PAGE nativa pela imponente força hidrodinâmica uniforme e características da carga em todas as proteínas da amostra. A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS) é muito utilizada para identificar e monitorar as proteínas durante o

processo de purificação, também para estimar os pesos moleculares e o tamanho das subunidades das proteínas presentes na amostra (GARFIN, 1990).

2.6 Propriedades funcionais

Além das propriedades nutricionais, as proteínas de plasma possuem propriedades funcionais que fazem delas um ingrediente amplamente utilizado em produtos alimentícios. A propriedade funcional depende das características físicas e químicas das proteínas e que afetam o processamento e o seu comportamento em um sistema alimentar, julgada pelos atributos de qualidade do produto final. Portanto, são as várias características que a proteína hidratada transmite ou com a qual contribui em um produto alimentício, e são entre outras: solubilidade, hidrofobicidade, capacidade de absorção e retenção de água e de óleo, viscosidade, capacidade emulsificante, e formação de géis e espumas (HARPER, 1992 citado por ROSEMBERG, 1995).

As propriedades funcionais podem ser divididas, para melhor entendimento, em fisiológicas e tecnológicas.

2.6.1 Propriedades funcionais tecnológicas

A funcionalidade de uma proteína reflete as complexas interações entre a composição de aminoácidos, a conformação estrutural e propriedades da proteína em si, bem como sua interação com outros componentes alimentares e a natureza do meio no qual ela está inserida (KILARA & SHARKASI, 1986). Elas afetam a aparência, a cor, a textura e a viscosidade de uma grande variedade de alimentos (SIKORSKI, 1997).

Diversos fatores como concentração protéica, pH, temperatura, tempo, força iônica e presença de outros componentes, afetam as forças que intervêm entre as interações proteína-proteína e proteína-água. A maioria das propriedades funcionais é determinada pelo equilíbrio entre essas forças.

Solubilidade

A solubilidade protéica é difícil de ser definida já que as proteínas em meio aquoso podem formar uma solução, uma dispersão coloidal ou uma suspensão estável de partículas insolúveis (BORDERÍAS & MONTERO, 1988). A solubilidade da proteína é uma propriedade importante para a utilização de suas funções em sistema alimentar, sendo extremamente crucial quando expressa em função do pH, que afeta a natureza e distribuição de cargas da proteína em cada alimento, em diferentes valores de pHs. Essa propriedade depende grandemente do número e arranjo de cargas nas moléculas, que por sua vez dependerá da composição dos aminoácidos, particularmente do número de resíduos ácidos (aspartil e glutamyl) e básicos (histidil, arginil e lisil) (SGARBIERI, 1998).

As variações de pH modificam a carga líquida da molécula de proteína, alterando as forças atrativas e repulsivas entre as proteínas e sua capacidade de interagir com a água. No ponto isoelétrico, onde a carga líquida da proteína é quase nula, as interações água-proteína são mínimas e as interações proteína-proteína são máximas, levando à formação de agregados e precipitados protéicos (BORDERÍAS & MONTERO, 1988). O'RIORDAN *et al.* (1989) trabalhando com plasma bovino, encontraram que as proteínas do plasma não aquecido são amplamente solúveis em toda a faixa de pH, apresentando um mínimo de solubilidade a pH 5, onde 80% das proteínas permaneceram em solução. Porém com aquecimento (60-90°C) a solubilidade das proteínas caíram para 50% no pH 5. A solubilidade da maioria das proteínas se reduz com o aquecimento.

ETHERIDGE *et al.* (1981) obtiveram para o isolado de proteínas plasmáticas tratadas com hexametáfosfato de sódio, um aumento na solubilidade em valores acima do pI (4,8-5,3). Abaixo dessa faixa de pH, as proteínas se apresentaram praticamente insolúveis. Isso mostra que a presença de fosfato interfere com a ionização dos aminoácidos a baixos pHs e/ou produz uma agregação isoelétrica irreversível.

Um outro fator que influencia a solubilidade é a hidrofobicidade na presença de íons e sais neutros (KUNTZ & BRASSFIELD, 1971). Geralmente, proteínas ricas em resíduos ionizáveis e com baixa hidrofobicidade de superfície, são solúveis em água e em soluções salinas. A hidrofobicidade representa o caráter não polar de um aminoácido, isto é, a energia livre que acompanha a transferência de aminoácidos da água para um solvente menos polar. (SIKORSKI, 1997).

Capacidade de Emulsificação

Emulsões são dispersões homogêneas de dois líquidos não miscíveis, quando um se encontra na forma de gotículas dispersas e o outro em fase contínua dispersante. É um sistema termodinamicamente instável, pois a diminuição do diâmetro das gotas devido a emulsificação aumenta exponencialmente a área interfacial e, com isso, aumenta a energia livre no sistema. Para prevenir a floculação, que são cremeadas com a ajuda da força gravitacional, um filme protéico ao redor dos glóbulos de gordura é formado (SIKORSKI, 1997).

Proteínas atuam como agentes emulsificantes por possuírem a capacidade de reduzir a tensão interfacial entre dois líquidos imiscíveis, permitindo a mistura dos dois, e estabilizando as gotas de óleo dispersas. Isso ocorre em função da natureza anfótera e flexível das proteínas, apresentando regiões hidrofóbicas e hidrofílicas com localizações distintas em sua estrutura (HIROTSUKA *et al.*, 1984) que permitem a formação de uma camada entre as duas fases, separando-as e impedindo que os glóbulos da fase interna coalesçam, o que resultaria numa quebra de emulsão.

Os critérios freqüentemente usados para descrever as propriedades emulsificantes são atividade emulsificante (AE), capacidade emulsificante (CE) e estabilidade da emulsão (EE). A habilidade da proteína em ajudar a formação e estabilidade da emulsão é a AE, o volume de óleo emulsificado por peso de proteína é definido como CE e a capacidade das gotas de emulsão permanecerem

dispersadas sem cremeamento, floculação ou coalescência é definido como EE (WANISKA *et al.*, 1981).

A emulsão passa pelo processo de formação e desestabilização, quase que simultaneamente. Os mecanismos que contribuem com isso estão representados na Figura 3 e são: a desproporção, que representa o crescimento de gotas maiores pela junção com as menores, a floculação, que como o próprio nome diz, é a formação de agregados e depende apenas da natureza dos grupos (resíduos polares provenientes das cadeias polipeptídicas, dos fosfolípido, sais etc)., o cremeamento, que é a separação da dispersão em uma emulsão concentrada superior e uma emulsão diluída inferior devido a diferença de densidade da fase contínua com a dispersa. Este processo é muito influenciado pela fase de floculação, já que os agregados “cremam” mais rapidamente que as gotas isoladas, e pelo maior tamanho da gota (WAGNER,2000).

A coalescência é irreversível, ao contrário da floculação e do cremeamento, pois resulta da ruptura do filme interfacial, fusão das gotas e separação final das fases. A resistência à coalescência depende de inúmeros parâmetros como as propriedades reológicas do filme protéico interfacial, a viscosidade da fase contínua, a distribuição do tamanho das gotas, a temperatura e a relação entre as fases. A inversão de fase é a transformação de uma emulsão A/O em O/A. Isto ocorre geralmente em emulsões com grande quantidade de fase dispersa submetidas a um trabalho mecânico enérgico (WAGNER, 2000).

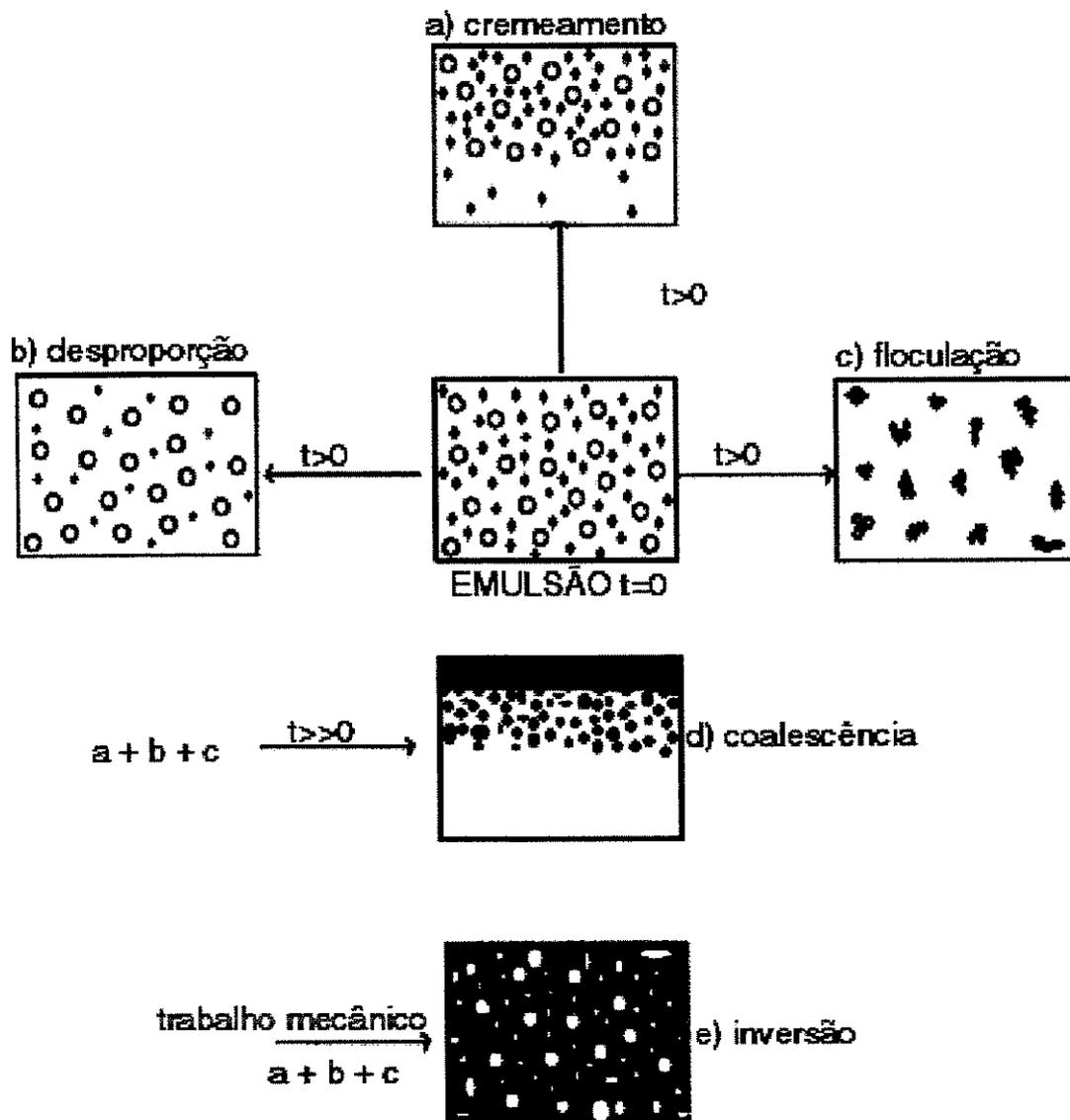


Figura 3. Representação dos processos básicos de desestabilização de emulsões.

As proteínas do plasma e as proteínas com hidrofobicidade de superfície e solubilidade mais alta tem um maior poder emulsificante que as proteínas do ovo (RAEKER & JOHNSON, 1995).

RAEKER & JOHNSON (1995) mostraram que o plasma comercial seco em spray emulsificou menos óleo que as amostras de laboratório secas em spray e liofilizadas, isto se deve à menor solubilidade do plasma comercial seco em spray. A estabilidade da emulsão também é afetada pela viscosidade. Há uma relação direta e linear entre essas propriedades, sendo que o aumento da viscosidade

gera um aumento na estabilidade da emulsão. Com isso, fatores que afetam a viscosidade, estarão afetando a estabilidade da emulsão. Por exemplo, a temperatura muito alta deixa o óleo menos viscoso, facilitando a coalescência das partículas de lipídio.

Capacidade de Formação de Espuma

Na indústria de alimentos e bebidas, a espuma pode ser um elemento desejável no produto final (CLARKSON *et al.*,2000). Geralmente espumas são dispersões de gotas de gás em uma fase contínua líquida ou semi-sólida que contém um surfactante solúvel. A capacidade de formação de espuma refere-se à expansão de volume da dispersão protéica com a incorporação de ar por batimento, agitação ou aeração. A capacidade de formação de espuma é muito importante mas, deve-se também levar em conta a estabilidade da espuma, que diz respeito à retenção de volume máximo de espuma formada em função do tempo de repouso.

Proteínas são moléculas de superfície ativa que estabilizam as espumas através da adsorção na interface gás/líquido. Esta adsorção diminui a tensão superficial local, causando gradientes de tensão superficial que estabiliza a estrutura da espuma (efeito Marangoni) (CLARKSON *et al.*,2000).

As proteínas que adsorvem passam por uma mudança na conformação conhecida como desnaturação de superfície, um processo de desdobramento dirigido pela reorientação das regiões hidrofóbicas da molécula de proteína em direção à fase gasosa (CLARKSON *et al.*,2000).

Alguns estudos (CLARKSON *et al.*,1999:I e 1999:II) mostram que a desnaturação da BSA é devido a desnaturação de superfície e que a taxa de dano pode ser relacionada com a taxa em que a área interfacial é criada na espuma. A área interfacial é criada durante a formação inicial de bolhas e durante a drenagem de líquido da lamela da bolha. A quantidade da área interfacial criada

pela drenagem é dependente da mobilidade da molécula da proteína na interface (CLARKSON *et al.*,2000).

No experimento com proteínas plasmáticas, ETHERIDGE *et al.* (1981) observaram que as proteínas fosforiladas com hexametáfosfato de sódio apresentou melhores resultados que as não fosforiladas e a ovalbumina na concentração de 1%. Uma provável explicação seria a presença de íons de sódio e fosfato que aumentam a viscosidade da dispersão protéica e a estabilidade da espuma.

O plasma tem uma capacidade de formação de espuma similar à clara do ovo mas a estabilidade da espuma é menor. Outros componentes do soro como a soroalbumina e a α globulina têm boa capacidade de formação de espuma e estabilidade.

O processamento não interfere na capacidade de formação de espuma mas afeta a estabilidade da espuma. Amostras liofilizadas produziram espumas instáveis com bolhas grandes, enquanto que as amostras secas em spray produziram bolhas finas e mais estáveis (RAEKER & JOHNSON,1995).

De acordo com HOWELL e TAYLOR (1995) a expansão e a estabilidade da espuma de proteínas do plasma foram aumentadas com o aumento de concentrações de ácido ascórbico (0,1-1%). BSA mostrou uma grande melhora nas propriedades espumantes após o tratamento com ácido ascórbico. A expansão da espuma de BSA (0,5% p/v) tratada com 0,1; 0,5 e 1% de ácido ascórbico e batido a pH 7 aumentou consideravelmente em função do aumento de concentração de ácido ascórbico e foi de respectivamente 10, 220 e 340% na expansão da espuma (CESP) da BSA. A presença de ácido ascórbico durante o processo de batimento foi necessária para que ele pudesse ter efeito nas propriedades espumantes da BSA. BSA nativa, BSA dialisada e BSA tratada com 1% de ácido ascórbico e então dialisada tiveram CESP de 300, 300 e 400%, enquanto que a CESP da BSA apenas tratada com ácido ascórbico foi de 1300%. A espuma da BSA nativa, BSA dialisada e BSA tratada com 1% de ácido

ascórbico e então dialisada apresentaram estabilidades similares, sendo que a BSA tratada com 1% de ácido ascórbico mostrou uma estabilidade bem superior.

DAMODARAM & YU (1991) estudaram a cinética de desestabilização da espuma de BSA. Relataram que a conformação da BSA é significativamente alterada pelas condições ambientes ou pela atividade de agentes desnaturantes, redutores, etc. As mudanças nas propriedades e conformação da BSA refletem-se dramaticamente na formação de espuma.

2.7 Planejamento experimental e Metodologia de superfície de resposta (MSR)

O método de planejamento experimental por análise de superfície de resposta tem como princípio a programação dos experimentos pelo planejamento fatorial (BOX et al., 1978), sendo possível a realização de um número de experimentos que abranja uma faixa suficiente para análise segura dos dados pelo ajuste dos resultados por modelos matemáticos. A modelagem normalmente é feita ajustando-se os modelos mais simples, como o linear e o quadrático.

Para a utilização desse tipo de planejamento representado de um modo geral por α^b , onde " α " é o número de fatores " b " é o número de níveis escolhidos, é necessário definir qual o objetivo dos experimentos (BARROS NETO et al., 1995). As variáveis devem ser escolhidas de forma que suas grandezas não interfiram no desenvolvimento do processo de otimização e os cuidados na realização dos experimentos e de suas replicatas devem ser observados.

Tendo o objetivo de realizar o mínimo de experimentos e determinar os fatores que tenham ou não influência significativa sobre a resposta, faz-se um planejamento fatorial, na forma de matriz, com dois níveis para cada fator, sendo comum codificá-los usando os sinais (+) e (-). Se n fatores estão contidos no estudo, o planejamento fatorial necessitará da realização de 2^n ensaios diferentes, cobrindo todas as combinações possíveis. Para a obtenção do erro experimental é

necessário a realização de pelo menos dois ensaios no ponto central (nível 0), correspondendo à média aritmética dos níveis -1 e $+1$ (SILVA, 1998).

Para obter um modelo de 2ª ordem e percorrer outros níveis ou condições experimentais não pressupostas pelo planejamento fatorial inicial, que apenas oferece modelo de 1ª ordem, pode-se ampliar o planejamento realizando experimentos nos pontos axiais, ou seja, completar o planejamento fatorial inicial com mais $2n$ experimentos (SILVA, 1998).

Sendo o planejamento experimental um método baseado em n observações e executado com técnicas estatísticas é de fundamental importância a avaliação dos modelos empíricos obtidos através da regressão dos dados experimentais. O exame dos resíduos é ferramenta importante na avaliação da qualidade do ajuste de qualquer modelo. A Tabela 2, conhecida como tabela de análise de variância (ANOVA), resume toda a análise estatística que avalia a qualidade do ajuste do modelo (BARROS NETO et al, 1995).

Tabela 2. Análise de variância

<i>FONTE DE VARIACÃO</i>	<i>SOMA QUADRÁTICA (SQ)</i>	<i>MÉDIA QUADRÁTICA (MQ)</i>	<i>GRAU DE LIBERDADE (GL)</i>	<i>TESTE F</i>
REGRESSAO	SQ_R	MQ_R	L-1	MQ_R / MQ_r
RESIDUO	SQ_r	MQ_r	N-L	
F AJUSTE	SQ_{faj}	MQ_{faj}	M-L	
ERRO PURO	SQ_{ep}	MQ_{ep}	N-M	
TOTAL	SQ_T		N-1	

R é relativo à regressão (modelo ajustado), r devido ao residual (desvio), faj à falta de ajuste e ep ao erro puro; L é o número de termos do modelo completo, M, o número de níveis distintos, N o número total de experimentos.

O valor de $SQ_T = SQ_R + SQ_r$, significa que uma parte da variação total das observações em torno da média é descrita pela equação ajustada e a outra parte devido aos resíduos. O valor da qualidade do ajuste é dado por SQ_R / SQ_T e extraindo-se a raiz quadrada desse valor obtém-se o coeficiente de correlação (R_a). O coeficiente de correlação representa a comparação da variância dos

pontos experimentais em relação ao modelo ajustado. Quanto mais próximo o valor de Ra estiver de 1, os valores previstos pelo modelo estão em concordância com os valores observados experimentalmente.

O teste F é outro parâmetro importante na verificação da validade estatística do modelo ajustado. Ele é utilizado para investigar se o modelo explica uma quantidade significativa da variação nos valores experimentais. Comparando-se o valor de F calculado pela regressão dos dados experimentais com o valor de F tabelado para uma distribuição de referência e encontrando valores de F acima de 3 vezes o valor de F tabelado, a regressão é útil para fins preditivos, ou seja, a equação ajustada é estatisticamente significativa e os valores experimentais são bem representados pelo modelo proposto pelo ajuste.

Os efeitos são definidos como resultados que descrevem a mudança na resposta frente a mudanças nas variáveis independentes, e podem ser classificados em efeitos principais e efeitos de interação. Deste modo supõe-se que a variável resposta y depende das variáveis explicativas $x_1, x_2, x_3, \dots, x_k$, e que portanto, y poderia ser representado como uma função de tais variáveis : $y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_k)$. Portanto, cada resposta poderá ser escrita da seguinte forma:

$$Y = B_0 + B_1 x_1 + B_2 x_2 + B_3 x_3 + B_{11} x_1^2 + B_{22} x_2^2 + B_{33} x_3^2 + B_{12} x_1 x_2 + B_{13} x_1 x_3 + B_{23} x_2 x_3$$

Onde B é a constante, B_1, B_2, B_3 correspondem aos coeficientes dos efeitos lineares, $B_{11}, B_{22}, B_{33}, B_{12}, B_{13}, B_{23}$, aos coeficientes dos efeitos de 2ª ordem (interativos) e x_1, x_2, x_3 representam o valor das variáveis independentes. O coeficiente B é a mudança que ocorre na resposta quando X_i é mudado de uma unidade. O efeito principal linear num planejamento fatorial com variáveis codificadas é a mudança na resposta quando X_i é variado de -1 para +1.

2.8 Referências bibliográficas

AKERS, J.M. Utilization of blood. **Food Manufacture**, London, v.48, n.4, p.31-32, 1973.

ALENCAR, F.A. Estudos da recuperação das proteínas do plasma bovino por compensação com fosfatos e sua utilização em produtos cárneos. Campinas, 1983. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

AVERY, C.G. Fractionation of blood by centrifugation. **Process Biochemistry**, London, v.7, n.3, p.20-23, 1972.

BARROS NETO, B., SCARMÍNIO, J.S., BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: ed. UNICAMP, 1995, 299p.

BORDERÍAS, A.J., MONTERO, P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos, **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v.28, n.2, p.159-169, 1988.

BOX, G.E.P., HUNTER, W.G., HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters**. New York: Willey, 1978. 652p.

BOYE, J.I; ALLI, I; ISMAIL, A.A. Interactions involved in the gelation of BSA. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.44, p.996-1004, 1996.

BRINK, W. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan. **Life Extension Report**, p. 21-28, 1996.

BUGOS, G.E. Managing cooperative research and borderland science in the national research council, 1922-1942. **Historical studies in the physical and biological sciences**. Berkeley, v.20, p.1-32, 1989.

- CLARKSON, J.R.; CUI, Z.F.; DARTON, R.C. Effect of solution conditions on protein damage in foam, **Biochemical Engineering Journal**, v.4, p. 104-114, 2000.
- CLARKSON, J.R.; CUI, Z.F.; DARTON, R.C. Protein desnaturation in foam: I Mechanism study, **Journal of Colloid Interface Science**, San Diego, v.215, n.2, p. 323-332, 1999.
- CLARKSON, J.R.; CUI, Z.F.; DARTON, R.C. Protein desnaturation in foam: II Surface activity and conformational change, **Journal of Colloid Interface Science**, San Diego, v.215, n.2, p. 333-338, 1999.
- COHN, E.J. et al. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fraction of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. **Journal of the American Chemical Society**, Boston, v.68, parte 1, p.459-475, 1946.
- COHN, E.J. et al. System for the separation of the components of human blood: quantitative procedures for the separation of the protein components of human plasma. **Journal of the American Chemical Society**, Boston, v.72, n.9, p.465-474, 1950.
- COHN, E.J.; EDSALL, J.T. **Proteins, aminoacids and peptides**, Reinhold, 1943.
- CREAGER, A.N.H. Producing molecular therapeutics from human blood: Edwin Cohn's wartime enterprise. In: CHADAREVIAN, S.; KAMMINGA, H. **Molecularizing biology and medicine: new practices and alliances, 1910s to 1970s**. Amsterdam: Overseas Publishers Association for Harwood Academic Publishers, p.107-138, 1998.
- CREAGER, A.N.H. What Blood told Dr Cohn: World war II, plasma fractionation and the growth of human blood research. **Studies in Histoy and philosophy of biological and biomedical sciences**. Oxford, v.30, n.3, p.377-405, 1999.

- DAMODARAM, S., YU, M. Kinetics of protein foam destabilization: Evaluation of a method using BSA, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, p.1555-1562, 1991.
- DE GRAAF, L.A. Denaturation of proteins from a non-food perspective. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.79,n.3, p. 299-305, 2000.
- ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques, in: **Methods in Enzymology-Guide to protein purification**, DEUTSCHER, M.P. London: Academic Press, v. 182, 894p., 1990.
- ERIKSSON, G., VON BOCKELMANN, I. Ultrafiltration of animal blood serum: technology and microbiology. **Process Biochemistry**, London, v.10, n.7, p.11-14, 1975.
- ETHERIDGE, P.A., HICKSON, D.W., HOUNG, C.R., LANDMANN, W.A., DILL, C.W. Functional and chemical characteristics of bovine plasma proteins isolated as a metaphosphate complex. **Journal of Food Science**, Chicago, v.46, n.6, p.1782-1784, 1981.
- FAO FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Protein Quality Evaluation. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Roma, 1990.
- GARFIN, D.E. One-Dimensional Gel Electrophoresis, in: **Methods in Enzymology-Guide to protein purification**, DEUTSCHER, M.P. London: Academic Press, v. 182, 894p., 1990.
- GÓMEZ-JUÁREZ, C.; CASTELLANOS, R.; PONCE-NOYOLA, T.; CALDERÓN, V.; FIGUEROA, J. Protein recovery from slaughterhouse wastes, **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.70, n.2, p.129-133, 1999.
- HALLIDAY, D.A. Blood - A source of proteins. **Process Biochemistry**, London, v.8, n.12, p.15-17, 1973.

- HIROTSUKA, M., TANIGUCHI, H. NARITA, H. KITO, M. Functionality and digestibility of a highly phosphorylated soybean protein. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.48, n.1, p.93-100, 1984.
- HOWELL, N.K.; TAYLOR, C. Effect of ascorbic acid on the foaming and gelling of globular proteins, **International Journal of Food Science and Technology**, New York, v.30, n.3, p. 321-334, 1995.
- ITO, Y. Centrifugal precipitation chromatography: principle, apparatus and optimization of key parameters for protein fractionation by ammonium sulfate precipitation, **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.277, p. 143-153, 2000.
- KILARA, A., SHARKASI, T.Y. Effects of temperature on food proteins and its implications on functional properties. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.23, n.4, p.323-395, 1986.
- KUBOTA, N., TATSUMOTO, N., SANO, T. Recovery of serum proteins using cellulosic affinity membranes modified with tannic acid. **Carbohydrate Polymers**, 40, p. 107-113, 1999.
- KUNTZ, I., BRASSFIELD, T. Hidratation of macromolecules-II Effects of urea in hidration, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v.142, n.2, p. 660-664, 1971.
- LARA, F. O., RAMÍREZ, F., SANCHEZ, N. Estudio para obtencion de proteínas de sangre bovino. **Tecnologia de Alimentos**, v.12, jul-out, p.141-144, 1977.
- O'RIORDAN, D., MORRISSEY, P.A., MULVIHILL, D.M. The effect of neutral salts and chemical reagents on the solubility and viscosity of plasma protein solutions. **Sciences des Aliments**, Paris, v.9, n.3, p.463-472, 1989.
- PENTEADO, M.V.C., LAJOLO, M.F., SANTOS, N.P. Functional and Nutritional Properties of Isolated Bovine Blood Proteins. **Journal of Science Food Agriculture**, London, v.30, p.809-815, 1979.

- PETERS, T.Jr; FELDHOF, R.C; REED, R.G. Immunochemical studies of fragments of bovine serum albumin. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v.252, n.23, dez 10, p.8464-8468, 1977.
- POLSON, A.; RUIZ-BRAVO,C. Fractionation of plasma with polyethylene glycol. **Vox Sanguinius**, Genebra, n.23, p.107-118, 1972.
- PORCELLI, M.C.;MARTINEZ, T.L.; EIRIS, A.A.; BURACHICK,M. Recoleccion higienica de sangre bovina. **NOTICITECA**, Buenos Aires, v.12, n.72, p.126-131, 1982.
- RAEKER,M.O., JOHNSON, L.A. Thermal and functional properties of bovine blood plasma and egg white proteins, **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, n.4, p. 685-690, 1995.
- REVISTA Eletrônica do Departamento de Química (QMCWEB): http://www.quimica.matrix.com.br/artigos/sangue_artificial.html, Bordeaux, Química - UFSC: Ano 3, n. 53, acesso em 14/04/2002.
- ROSEMBERG, M. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, p.12-25, 1995.
- ROUHANA, R.; BUDGE, S.M.; MACDONALD, S.M.; ROSCOE, S.G. Electrochemical studies of the interfacial behavior of α -lactalbumin and bovine serum albumin. **Food Research International**, Oxford, v.30, n.1, p.13-20, 1997.
- SANDER,A., EILERS, E., HEILEMANN, A.,VON KRIES, E. Production and applications of protein/fatty acid condensates. **Fett/Lipid**, Weinheim, v. 99, n.4, p. 14-20, 1997.
- SCHNEIDER, W.; LEFREVE, H.; FIELDER, H.; McCARTY, L.J. Na alternative method of large scale plasma fractionation for the isolation of serum albumin. **Blut**, Hanover, v.30, n.2, p.121-134, 1975.

- SCHNEIDER, W.; WOLTER, D.; McCARTY, L.J. Alternatives for plasma fractionation. **Vox sanguinius**, Genebra, v.31, p.141-151, 1976.
- SGARBIERI, V.C. Propriedades Funcionais de Proteínas em Alimentos, Bol SBCTA, Campinas, v.32, n.1, p.105-126, 1998.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos propriedades de degradações – modificações**. São Paulo: Varela, 1996, 517p.
- SHIAU, K.S., CHEN,T.L. Initial protein concentration effects on precipitation by salt. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 53, n.2, p. 202-206, 1997.
- SHIH,Y; PRAUSNITZ, J.M.; BLANCH, H.W. Some characteristics of protein precipitation by salts, **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.40, n.10, p. 1155-1164, 1992.
- SIKORSKI, Z.E. **Chemical and functional properties of food components**. Lancaster: Technomic Publishier Co., 1997,293p.
- SILVA, F.L.H. Modelagem, Simulação e Controle de Fer,mentação Alcoólica Contínua Extrativa. Campinas, 1998. 162p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SMITHERS, G. W., BALLARD, F. J., COPELAND, A.D. Symposium: advances in dairy foods processing and engineering. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, Bethesda, v. 79, p. 1454 -1459, 1996.
- TANAKA, K. Fracionamento do plasma bovino para isolamento da albumina e sua liofilização. São Paulo, 1987. Dissertação (Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP.

WAGNER, J.R. *Propiedades Superficiales in: Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas*, 1ª ed., Eudeba, Buenos Aires, 81p., 2000.

WANISKA, R.D., SHETTY, J.K., KINSELLA, J.E. Protein-stabilized emulsions: Effects of modification on the emulsifying activity of bovine serum albumin in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.29, p.826-831, 1981.

WISMER-PEDERSEN, J. Utilization of animal blood meat products. *Food Technology*, Chicago, v.33, n.8, p.76-80, 1979.

Capítulo3. Obtenção e caracterização química das frações albumina (BSA) e globulina (GB)

RESUMO

O sangue retirado de animais sadios e recém abatidos foi mantido em repouso para extração do soro, o qual foi usado como matéria-prima. Adições de sulfato de amônio em condições adequadas de temperatura, a concentrações de 50% e 80% foram efetuadas para recuperação respectiva de globulinas (GB) e albuminas (BSA). As frações BSA e GB foram analisadas quanto sua composição centesimal, em aminoácidos e minerais. O valor nutritivo foi avaliado através da digestibilidade *in vitro*, sendo representado pelo PDCAAS, índice que corrige a digestibilidade pelo aminoácido mais limitante da proteína, dando uma estimativa da absorção e utilização deste produto pelo organismo humano. A BSA possui alto teor de lisina, histidina e aminoácidos sulfurados, valores que superam em dobro o padrão utilizado. A GB, apesar de fornecer os aminoácidos essenciais acima da quantidade exigida, possui quase todos em valores inferiores ao do soro integral. A BSA possui cálcio, zinco, manganês e ferro em quantidades superiores à GB e ao soro integral. A presença do ferro em concentração relativamente elevada indica que houve hemólise no processo de obtenção do soro e que a maior parte da hemoglobina foi precipitada com 80% de concentração salina. A secagem em *spray dryer* não alterou a composição em proteínas das frações protéicas quando

comparadas às frações liofilizadas mas aumentou o teor de umidade ($p < 0,05$). Houve também uma redução na quantidade de lipídios da BSA devido à temperatura utilizada.

3.1 Introdução

Produtos naturais raramente existem em um estado de máxima pureza ou alta concentração em plantas ou fluidos animais, estando frequentemente em pequenas quantidades ou em estado físico inativo sendo estocados como reservas biológicas (COHN *et al.*, 1946).

O isolamento das frações protéicas do sangue bovino permite que se agregue valor ao produto, pois facilita sua aplicação em sistemas específicos.

São várias as vantagens de ter o sangue bovino como provedor de proteínas: o baixo custo do sangue, a solução de um problema ambiental que prejudica além do meio ambiente, os abatedouros, a excelente qualidade nutricional dessas proteínas, semelhantes à da carne, e a alta compatibilidade com o organismo.

Este capítulo detém-se em verificar as características químicas das proteínas do soro de sangue bovino isoladas, utilizando o método de precipitação seletiva com sulfato de amônio. Neste método, é necessário fazer-se uma prévia saturação para isolar as globulinas antes que se obtenha a proteína principal, a BSA.

A BSA possui uma estrutura muito complexa e interessante do ponto de vista físico-químico-biológico devido suas pontes dissulfeto e a quantidade de resíduos sulfurados, e por isso é muito empregada como ingrediente nobre em laboratórios farmacêuticos e vem servindo como base de estudo nas demais áreas.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Obtenção e Preparo da Matéria-Prima

O soro de sangue com o qual foram realizados os testes, foi proveniente do frigorífico GJota situado em Promissão – SP e processado pela TECSORO Comercial Ltda, instalada dentro do frigorífico para processar o sangue recém extraído do animal.

O sangue foi coletado de maneira higiênica, imediatamente após o abate através do uso da “faca vampiro” por punção direta da veia jugular (*Arcus aortae*) em recipientes de inox previamente escaldados com vapor. Foi mantido em uma sala climatizada a 20 °C por aproximadamente 1 hora, tempo necessário para que ocorresse a coagulação. Os coágulos foram retalhados e passados em filtros de tela grossa. A purificação do líquido filtrado foi feita com o auxílio de uma centrífuga a disco (WESTFALIA, MTA-9), numa velocidade de 9000 g em temperatura mantida em 20 °C.

Após a separação, o soro foi embalado em sacos de polietileno de 5kg, submetido a um túnel de resfriamento rápido a -30°C e armazenado em câmaras em temperatura constante de -25°C.

3.2.2 Curva de Salting out

Sulfato de amônio foi acrescentado ao soro de sangue bovino em diversas condições de saturação (DAWSON *et al.*, 1969) e a solução foi mantida em agitação constante e em banho de gelo, de forma que a temperatura permanecesse próxima a 0°C. O sal foi adicionado aos poucos e somente depois que toda a quantidade anterior estivesse completamente dissolvida. O vaso contendo o material inicial foi equipado com um eletrodo para monitoramento de pH e um agitador magnético. Com o término da adição de sal, a mistura permaneceu em agitação por aproximadamente trinta minutos para equilibrar o

solvente e a proteína e posteriormente foi mantida em repouso por 8 horas a 5°C. Fez-se então a centrifugação da solução que apresentou separação visual de fases, a 7600 g por 10 minutos, numa centrífuga (SORVALL, RC26plus) pré-resfriada a 0-4°C. Ao sobrenadante foi adicionada a quantidade de sal necessária para obter a próxima saturação desejada.

A diálise foi realizada em membrana D-9527 (Sigma), obtida em rolos e cortada em sacos de 40cm, num volume de água (5°C) dez vezes superior à fração precipitada durante três dias, sendo que as trocas de água eram feitas duas vezes ao dia. As frações dialisadas foram liofilizadas (FTS SYSTEM, condições citadas adiante) e analisadas, determinando-se a quantidade de proteína presente e colocando-se em um gráfico em função da saturação de sal.

As frações protéicas foram identificadas por eletroforese e densitometria, indicando as bandas de proteínas presentes. A eletroforese foi realizada em gel de policrilamida em presença de SDS, em equipamento Phastsystem-Pharmacia. O densitômetro usado foi Pharmacia Image Master 1D Primer.

3.2.3 Isolamento das Frações Protéicas

As frações protéicas do soro foram obtidas pela precipitação seletiva com sal sulfato de amônio até os pontos de saturação de cada fração, 50 e 80%, respectivamente para GB e BSA (DAWSON *et al.*, 1969).

Após a centrifugação, os precipitados foram ressuspensos em água e dialisados, para a eliminação do sal usado. A Figura 4 mostra esquematicamente o método de obtenção das frações protéicas a partir do soro de sangue bovino.

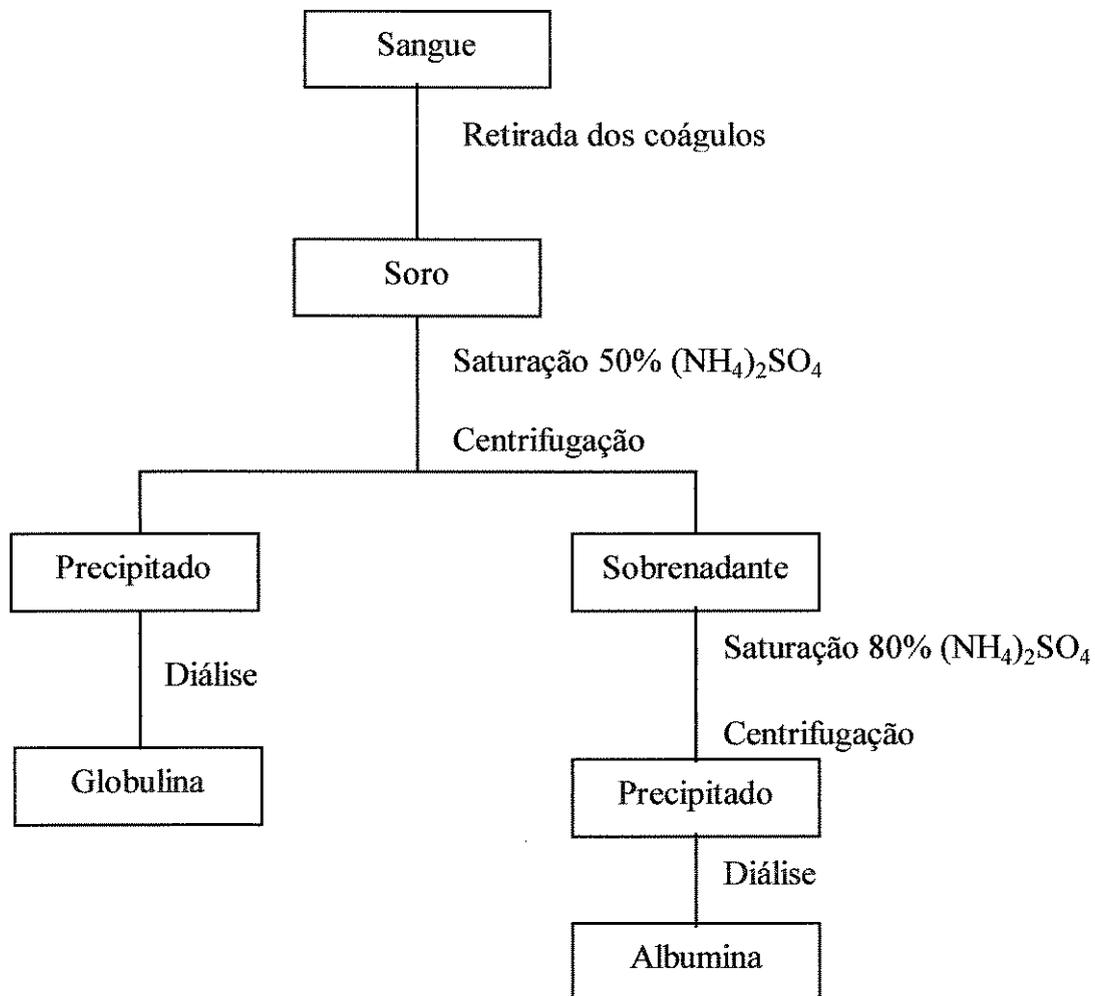


Figura 4. Fluxograma do processo de separação das frações protéicas do soro sanguíneo.

As frações protéicas separadas do soro sanguíneo foram confirmadas através do método de eletroforese em presença de SDS.

3.2.4 Método de Secagem

As características da BSA e da GB quanto à sua composição química e propriedades funcionais foram comparadas após dois métodos de secagem: a liofilização e a secagem por atomização em *spray dryer*.

Os métodos foram comparados, para observar a viabilidade de produção das frações protéicas em uma indústria, já que o processo de liofilização, apesar

de mais brando e por isso não alterar muito as características estruturais do produto, é muito mais caro que a secagem em *spray*.

Condições de Liofilização:

O processo de liofilização foi feito em liofilizador STOKES com capacidade de condensação de 30 kg, instalado na planta de operações unitárias do Grupo de Engenharia/Ital. No processo de congelamento inicial ($T=-25^{\circ}\text{C}$), finas camadas de 0,5cm do material foram distribuídas em bandejas de inox retangulares sendo a maior de 60x100cm e o processo de liofilização pôde ser monitorado com a colocação de um termopar no material da bandeja.

Condições de Spray Drying:

A etapa de secagem da BSA e GB em *spray dryer* foi realizada em equipamento de laboratório A/S NIRO ATOMIZER COPENHAGEN DENMARK, N.1199, sendo a temperatura de entrada controlada a 250°C e a de saída mantida a 80°C .

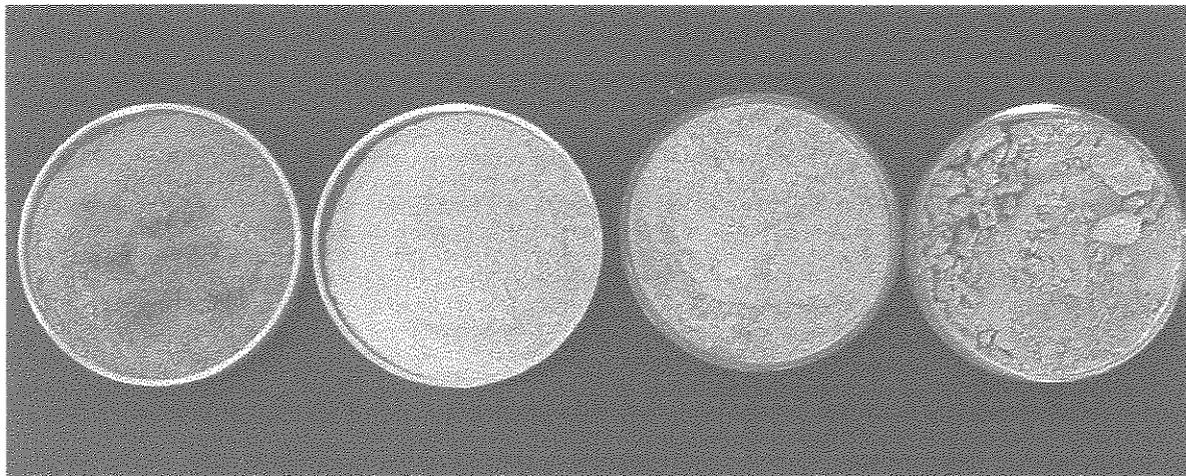


Figura 5. Frações protéicas obtidas a partir do soro de sangue bovino. Da esq para dir: Soro integral bovino liofilizado, GB liofilizada e BSA liofilizada e desidratada em *spray dryer*.

3.2.5 Caracterização química

Composição centesimal

Carboidratos Totais: Determinados por diferença centesimal da somatória dos demais constituintes da amostra .

Lipídios Totais: Foram determinados pelo método descrito por BLIGH & DYER (1959), empregando-se os solventes clorofórmio, metanol e água para extração dos lipídios.

Proteína: A proteína da amostra foi analisada pelo método de Kjeldahl que consiste em três etapas: digestão, destilação e titulação. A digestão foi feita a partir de 10 a 50 mg da proteína, com 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 g de catalisador (TiO₂, CuSO₄, K₂SO₄ (0,3;0,3;10)), em bloco digestor Tecator, aumentando-se a temperatura lentamente, 50°C a cada 20 min, até 400°C e então permanecendo nesta temperatura por 30 min.

A destilação feita em destilador Tecator, que coleta num erlenmeyer de 250 mL a solução de proteína a ser titulada. A titulação é feita com ácido clorídrico variando de 0,05 a 0,2N dependendo da quantidade de proteína presente.

O cálculo permite conhecer a quantidade de nitrogênio total (protéico e não protéico) presente na amostra e através de um fator de conversão, obtém-se a quantidade de proteína bruta por 100g de amostra.

$$\%N = \frac{(mL\ HCl\ amostra - mL\ HCl\ branco)N\ HCl.0,014}{peso\ amostra\ (g)} .100$$

$$\% \text{ de Proteína Bruta} = \%N \times 6,25$$

Cinzas: É um termo analítico equivalente ao resíduo inorgânico que fica depois de calcinar a matéria orgânica de uma amostra. Sua determinação fornece uma indicação da riqueza da amostra em elementos minerais. A análise foi feita

incinerando-se com o uso do bico de bunsen, aproximadamente 3 g de material em cadinhos de porcelana tarados. O término do processo de incineração ocorreu com o desaparecimento de uma fumaça branca e o material então, passou por um processo de calcinação em mufla a 500°C por 4 horas. Depois de frio, os cadinhos contendo as cinzas da amostra foram pesados e comparados com o peso inicial, como segue:

$$\%cinzas = \frac{(\text{peso cadinho} + \text{cinzas}) - \text{peso cadinho}}{\text{peso amostra (g)}} \cdot 100$$

Umidade: O teor de umidade é definido pela mudança no peso da amostra, determinada sob certas condições de temperatura e pressão e o tempo de secagem varia de acordo com o tipo de amostra. A amostra foi colocada em estufa a 100°C durante 12 horas, para que houvesse a certeza de que toda a água não ligada tivesse sido evaporada e depois mantida em dessecador com sílica até temperatura ambiente (AOAC, 1990). O cálculo é feito como segue:

$$\%umidade = 100 - \left(\frac{\text{peso da amostra seca (g)}}{\text{peso da amostra úmida (g)}} \cdot 100 \right)$$

Composição em aminoácidos

As amostras foram hidrolisadas com HCl 6N em tubos de hidrólise, selados à vácuo e mantidos a 110°C por 22 horas. Após a incubação, o ácido clorídrico foi evaporado e fez-se a recuperação da amostra em tampão citrato pH 2,2. Uma alíquota de 25µL foi injetada no analisador (Dionex Dx-300), para separação dos aminoácidos em coluna de troca catiônica e reação pós-coluna com ninidrina (SPACKMAN *et al.*, 1958). Solução padrão de aminoácidos Pierce foi utilizada como referência.

O triptofano foi determinado segundo SPIES (1957), onde 25 mg de amostra foram adicionados 0,4 mL de solução da enzima pronase (Merck) (100mg/10 mL de tampão) e 3,6 mL de tampão (fosfato de sódio 0,1M, pH 7,5) e

deixados em banho-maria a 40°C por 22 horas. Após a centrifugação a 3000g (Centrífuga IEC, modelo UV, 115V, 60 ciclos; rotor 267 com copos de 5 posições para tubos de vidro (Ref. 989)), o precipitado foi lavado com 4 mL de tampão e centrifugado novamente. Os sobrenadantes das duas centrifugações foram colocados em um balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com tampão. A 1mL desta solução foram adicionados 9 mL de DAB (diaminobenzaldeído) e deixados no escuro por 6 horas. No final deste período foi adicionado 0,1 mL de NaNO₂ (0,0045%) e após trinta minutos fez-se a leitura em Espectrofotômetro HITACHI U-2000 a 590 nm. O valor de absorbância obtido foi comparado com uma curva padrão feita para o triptofano, determinando-se quantitativamente o valor deste, presente na amostra.

Escore de aminoácidos essenciais (EAE) e digestibilidade in vitro corrigida pelo EAE (PDCAAS)

Com a análise de aminoácidos das frações do soro sanguíneo, pôde-se a determinar o EAE. Ele indica qual o aminoácido essencial da amostra é o mais limitante, em comparação com um padrão. Neste caso, foi calculado tomando-se como referência os aminoácidos do padrão da FAO/WHO/UNU (1985) de acordo com HENLEY & KUSTER (1994). Os quocientes obtidos indicam a ordem dos aminoácidos limitantes, e o valor encontrado para o mais limitante é uma estimativa do valor nutritivo da proteína em relação à referência (SGARBIERI, 1996). A fórmula para determinar o escore de aminoácidos essenciais é dada pela relação abaixo:

$$EAE = \frac{\text{mg de aminoácido} / \text{g de proteína teste}}{\text{mg de aminoácido} / \text{g de proteína referência}}$$

A digestibilidade da proteína *in vitro* foi realizada conforme AKESON & STAHMANN (1964). As amostras contendo cerca de 250mg de proteínas foram feitas em duplicatas e hidrolisadas por digestão enzimática com pepsina (3 horas)

e pancreatina (24 horas) a 37°C em agitação contínua. A seguir, fez-se a precipitação da proteína não-hidrolisada com ácido tricloroacético (TCA) e na fração solubilizada filtrada determinou-se o nitrogênio contido nos aminoácidos e peptídios de baixo peso molecular. A caseína foi empregada como padrão de referência. A digestibilidade foi calculada como:

$$\text{Digestibilidade corrigida (\%)} = \frac{(Nd - Nb - Ne)}{Nt - Nb} \times 100$$

em que:

Nd = mg de N digerido; Nb = mg de N originalmente solúvel da amostra; Ne = mg de N produzido pela autodigestão do sistema enzimático; Nt = mg de N total da amostra.

O índice químico (PDCAAS estimado) foi obtido pela multiplicação do escore de aminoácidos essenciais (EAE) pela digestibilidade da amostra em questão.

Determinação de minerais

A maioria dos minerais (cálcio, fósforo, potássio, sódio, magnésio, zinco e cobre) foi determinada de acordo com ANGELUCCI & MANTOVANI (1986) depois de uma mineralização das amostras em mufla a 450°C e diluição em ácido nítrico 5%.

Para análise de ferro, as amostras foram submetidas a processo de destruição da matéria orgânica por via úmida com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio até digestão completa, sendo então diluídas em ácido clorídrico 5% (SLAVIN et al., 1975). A quantificação dos minerais foi realizada em espectrômetro de emissão de plasma de argônio (ICP-2000 BAIRD), versão simultânea, frequência de 40 Mhz, potência de 1000 W, nebulizador pneumático concêntrico e tocha de baixo fluxo. O fluxo de entrada das amostras foi de 3mL/min e do argônio de 15 mL/min (IMO INDUSTRIES INC ICP-2000 BAIRD, 1990).

Eletroforese

Foi realizada em equipamento Phastsystem (Pharmacia), de acordo com as instruções do fabricante, e consistiu na solubilização de uma quantidade pequena de amostra (100mg) com β -mercaptoetanol e tampão Tris-HCl 6N, pH 6,8. As amostras foram então colocadas numa placa contendo mini-poços, onde cada poço corresponde a uma amostra numa determinada concentração. Com um pente acrílico apropriado fez-se a transferência das amostras para o gel na câmara de corrida. A corrida feita em gel tampão contendo SDS 8-25%, teve seu término determinado pela chegada do marcador de frente, azul de bromofenol, ao final do gel de separação. Transferiu-se o gel para uma solução corante, contendo Comassie Blue, por duas horas à temperatura ambiente e, após este período, foi mantido em solução descorante (ácido acético: metanol: água (1:3:6)), por quatro horas. Os géis foram guardados entre folhas de papel celofane, previamente umedecido com uma solução ácido acético glacial: glicerol: água (1:1:8) durante uma semana.

Densitometria

A densitometria é uma técnica muito utilizada para identificar e quantificar os componentes da amostra no gel de eletroforese podendo-se caracterizá-las de acordo com seus pesos moleculares. Foi feita em densitômetro Pharmacia Image Master 1D Primer.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Recuperação da proteína

A literatura cita uma variedade de métodos de obtenção e recuperação das frações protéicas do sangue bovino (AVERY, 1972; HALLIDAY, 1973; LARA *et al.*, 1977; PORCELLI *et al.*, 1982; GÓMEZ-JUARÉZ *et al.*, 1999; RITO-PALOMARES *et al.*, 2000). O método adotado mostrou uma recuperação total de proteínas de

99% e em albuminas 71%. TANAKA (1987) reproduzindo o método 5 e 6 de Cohn com sangue bovino, mostrou que este último apresentou uma recuperação média de 76,6% em albuminas, e o método 5 um rendimento menor, porém nestes métodos ocorrem um desperdício das demais proteínas em função da recuperação das albuminas, além do mais, o autor parte do plasma sendo que uma etapa de fracionamento é realizada para retirar o fibrinogênio da solução plasmática.

3.3.2 Porcentagem de recuperação das proteínas

Para a escolha da faixa de concentração salina a ser utilizada para a separação das frações protéicas, foi realizada a curva de *salting out*, mostrada na Figura 6, sob a forma de proteína recuperada em cada estágio de saturação.

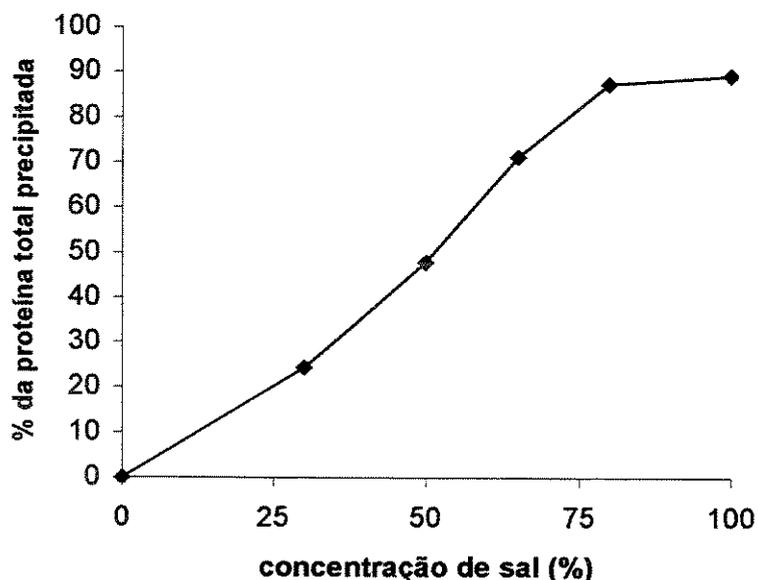


Figura 6. Porcentagem de proteína precipitada em cada saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

O efeito *salting out* depende principalmente da natureza dos íons salinos. Os sais exercem efeito de desidratação das proteínas através da competição de seus íons pelas moléculas de água. Com a adição de sal, o pH da solução muda e essa acidificação provoca uma redução da carga positiva da rede protéica pela ligação dos ânions do sal às proteínas e, portanto a solubilidade diminui (SHIH *et*

al., 1992). A centrifugação da solução também interfere no processo de precipitação *salting out*. A duração da força centrífuga aplicada irá depender principalmente da distribuição do tamanho da partícula da proteína agregada, da diferença de densidade entre a solução salina e a proteína, da viscosidade da solução salina e da força gravitacional aplicada (SHIH *et al.*, 1992).

Foram utilizados cinco níveis de saturação: 30, 50, 65, 80 e 100% e a quantidade máxima de proteína recuperada foi de 92%, sendo que o restante permaneceu em solução, mesmo com 100% de saturação. As frações protéicas de cada estágio de saturação, foram identificadas por eletroforese, indicando as bandas de proteína presentes (Figura 7).

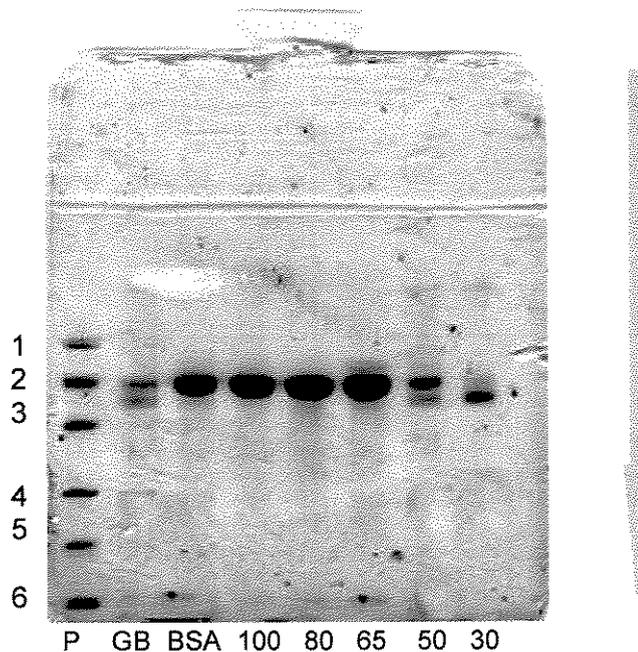


Figura 7. Eletroforese em gel SDS, Tris HCl, pH 6,8. P (padrão), GB (globulina obtida em grande escala na saturação de 50%), BSA (BSA obtida em grande escala na saturação de 80%), frações obtidas da saturação do soro com 100%, 80%, 65%, 50%, 30% de sulfato de amônio. Os números à esquerda do gel identificam as massas moleculares dos padrões utilizados. A referência utilizada na primeira coluna do gel, identificada como P, são constituídas por proteínas de massas moleculares: 94 000 – fosforilase b; 67 000 – BSA; 43 000 – ovalbumina; 30 000 – anidrase carbônica; 20 000 – inibidor de tripsina; 14 400 - α lactalbumina

Através da análise por densitometria, pôde-se quantificar a porcentagem de proteínas de massas moleculares diferentes presente em cada fração isolada, os

resultados são apresentados na Tabela 3. Na densitometria, faz-se um escaneamento do gel e pode-se ver com mais clareza as diferentes bandas nas amostras analisadas.

Tabela 3. Porcentagem de proteínas precipitadas com diferentes saturações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e seus massas moleculares.

Proporção das frações separadas em cada saturação (%)							
MM	30	50	65	80	100	BSA	GB
30000	17,63	14,83					
57000	40,63	37,56					41,78
62000							
65000			86,84	95,27	95,39	90,71	
67000	41,74	47,60					46,81
72000							
76000			13,16	4,73	4,61	9,29	
81000							11,41

A diferença no processo de obtenção da amostra GB e da fração 50% de saturação consistiu na utilização de uma quantidade bem maior de material para retirada de proteínas e de não ter havido prévia saturação. Foram detectadas, nestas amostras, duas bandas com altas quantidades de proteína, em 57000 e 67000 Da. As amostras mostraram-se idênticas, porém com contaminantes de massas moleculares diferentes.

As amostras 80, 100 e BSA possuem a maioria de proteínas com peso molecular de 65000 Da, porém a BSA, obtida em grande escala, tem uma porcentagem de contaminantes 50% maior que as demais amostras. Observa-se que o processo para obtenção de quantidades menores de proteína, com saturações prévias menos distantes, como no caso da amostra 80%, aumenta a pureza da amostra, provavelmente por remover proteínas contaminantes nas

saturações anteriores. A faixa para obtenção das frações protéicas do soro sangüíneo mostrou estender-se até a saturação máxima, sendo que o produto obtido nesta saturação possui um grau de pureza de 95,39%, porém sem vantagens em utilizá-las, já que a quantidade de sal aplicada será maior e com isso aumenta o custo e o esforço para eliminá-lo.

A amostra com 65% saturação apresentou além da banda mais forte (65000Da), uma mais fraca em 76000Da, correspondendo a 13% do total de proteína que equivale à fração de γ globulina (73000Da). A saturação de 30% mostrou duas bandas claras com 67000 e 57000 Da correspondente a 40%, aproximadamente cada uma e uma faixa contaminante numa massa molecular menor, equivalente a 17% do total protéico.

Apesar do método conseguir isolar as frações protéicas com sucesso, seria necessário um processo posterior à obtenção, para purificar as frações para fins farmacêuticos. Todos os métodos revisados na literatura também necessitam deste passo para garantir a pureza de 99%.

O escalonamento do método de fracionamento por precipitação com sulfato de amônio não seria viável pela quantidade de sal utilizada, pelas condições controladas de temperatura durante todo o processo e pelas diferenças na composição das frações precipitadas, dificultando a reprodutibilidade.

3.3.3 Caracterização química

Composição centesimal

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da caracterização química das frações protéicas do soro do sangue bovino e do soro integral desidratadas por liofilização. A composição em carboidratos pode ser feita pela diferença centesimal com a somatória dos componentes.

Tabela 4. Composição centesimal das frações e do soro de sangue liofilizadas.

Componentes(%)	BSA*	GB*	Soro integral*
Proteína	83,33 ± 0,03 ^a	85,36±0,04 ^a	83,50± 0,32 ^a
Cinzas	0,42 ± 0,01 ^a	0,26±0,05 ^c	0,35± 0,02 ^b
Umidade	7,46 ± 0,13 ^a	6,36±0,21 ^b	6,71± 0,04 ^b
Lipídios	5,42 ± 0,05 ^a	1,7±0,05 ^b	1,50± 0,32 ^b
Total determinado	96,6	93,68	92,06

*Média de três repetições analíticas ± desvio padrão. P< 0,05.

A fração GB não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) da BSA em relação à quantidade de proteína presente, porém a composição das amostras difere muito na quantidade de lipídios e isto se deve ao fato da estrutura da BSA ligar ácidos graxos e outros lipídios. O soro foi liofilizado integralmente sem passar por processo de diálise podendo apresentar composição centesimal diferente após esse processo.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da caracterização química das frações protéicas do soro do sangue bovino obtidas a partir da desidratação por *spray dryer*, comparadas às frações liofilizadas. A amostra denominada “BSA retida no spray” refere-se à mesma BSA obtidas pela desidratação por atomização em *spray dryer*, porém esta não foi recolhida na saída do spray, permanecendo dentro da câmara de secagem como resíduo para descarte.

Tabela 5. Composição das frações do soro de sangue liofilizadas e secas em spray.

Composição (%)	*BSA	*BSA	* BSA retida	*GB	*GB
	spray	liofilizada	no spray	spray	liofilizada
Proteína	83,35± 0,03 ^{ab}	83,33±0,03 ^{ab}	81,62±0,07 ^b	84,30±0,09 ^a	85,36±0,04 ^a
Cinzas	0,64± 0,03 ^b	0,42 ± 0,01 ^c	0,77±0,03 ^a	0,39±0,01 ^c	0,26±0,05 ^d
Umidade	9,81 ± 0,11 ^a	7,46 ± 0,13 ^c	8,16 ± 0,10 ^b	6,14 ± 0,06 ^d	6,36±0,21 ^d
Lipídios	4,75 ± 0,40 ^b	5,42 ± 0,05 ^a	4,46 ± 0,10 ^c	1,69 ± 0,04 ^d	1,7±0,05 ^d
Total	98,55	96,6	95,01	92,52	93,68

* Média de três determinações analíticas ± desvio padrão. P< 0,05.

O processo de secagem por *spray dryer*, nas condições utilizadas, não alterou a composição das amostras quanto à quantidade de proteína presente, mas houve uma redução na composição em proteína do resíduo, provavelmente devido alguma porção de sulfato de amônio residual da diálise ter volatilizado pelo excesso de temperatura. Este processo acarretou uma diminuição da quantidade de lipídios da BSA, e a fração que permaneceu mais tempo na câmara de secagem a alta temperatura, também teve uma redução significativa em relação à amostra original.

As amostras liofilizadas apresentaram um teor de umidade mais elevado, comparado com as amostras secas em *spray*, devido às condições de embalagem e armazenamento do produto.

A BSA retida no *spray* apresentou maior concentração de cinzas que a amostra original e, nitidamente, uma consistência diferente. A quantidade de cinzas das demais amostras podem ter diferido em função da eficácia no processo de diálise das frações, pois foram obtidas em diferentes processamentos.

Composição em aminoácidos

Os valores encontrados para a composição aminoacídica da BSA, GB e soro de sangue bovino integral liofilizados estão apresentados na Tabela 6, o perfil de aminoácidos essenciais é comparado com o padrão da Food and Agriculture Organization (FAO/WHO/UNU, 1990) e ao plasma da literatura (DUARTE, 1997).

A Tabela 6 e Tabela 7 foram organizadas em aminoácidos essenciais, ou seja, os que devem ser fornecidos, pela dieta, pois sua síntese é inadequada para satisfazer as necessidades metabólicas, e em não essenciais. Os não essenciais são igualmente importantes na estrutura protéica, porém na falta deles, podem ser sintetizados a partir dos essenciais ou de precursores contendo carbono e nitrogênio (LAJOLO & TIRAPEGUI, 1998). O padrão foi escolhido para crianças de 2 a 5 anos, pois a ausência ou a ingestão inadequada desses aminoácidos nesta

fase, afeta o desenvolvimento mental e físico, e também pelo fato delas terem maior necessidade nutricional destes aminoácidos que adultos de 25-45 anos.

Tabela 6. Composição de aminoácidos das frações protéicas do soro de sangue bovino e do soro integral liofilizadas.

Aminoácidos (g /100g de proteína)	BSA	GB	Soro	Plasma ²	FAO ¹
Essenciais					
Lisina	12,40	7,21	9,13	7,47	5,8
Treonina	5,80	6,71	6,56	6,60	3,4
Valina	5,86	6,47	6,40	6,73	3,5
Leucina	11,68	7,46	9,52	9,34	6,6
Isoleucina	2,45	2,46*	2,55*	3,35	2,8
Triptofano	0,77*	1,89	1,40	1,18	1,1
Histidina	4,28	2,71	3,49	4,18	1,9
½ Cistina	5,06	2,56	3,64	1,68	
Metionina	1,02	1,01	1,19	0,86	
Sulf. totais	6,08	3,57	4,83	2,54	2,5
Tirosina	5,05	4,54	4,95	4,78	
Fenilalanina	6,70	4,24	5,39	5,16	
Arom. totais	11,75	8,78	10,34		6,3
Não essenciais					
Ac. Aspártico	11,60	8,42	10,05	9,80	
Serina	4,98	7,88	7,14	6,67	
Ac. glutâmico	17,65	11,38	14,54	14,08	
Prolina	4,74	4,99	5,04	4,74	
Glicina	2,36	3,47	3,22	3,39	
Alanina	6,54	4,07	5,22	5,00	
Arginina	5,95	4,69	5,46	3,30	
EAE (%)	70(Trp)	87,8 (Ileu)	91,1 (Ileu)		

¹ Padrão teórico da FAO/WHO/UNU, 1990 (aminoácidos indispensáveis para crianças de 2 a 5 anos de idade). ² DUARTE, 1997 * aminoácido mais limitante.

As duas frações e o soro integral possuem a maioria dos aminoácidos essenciais em quantidades superiores ao recomendado pela FAO/WHO (1990),

sendo que o aminoácido mais limitante é a isoleucina na GB e no soro integral e o triptofano na BSA. O *escore de aminoácidos essenciais* foi calculado com base no aminoácido mais limitante. É interessante observar que a BSA possui uma quantidade de cistina muito superior à recomendada e em relação às outras amostras. Isto era de se esperar já que é uma característica da BSA, a grande quantidade de ligações dissulfeto, ao que pode ser atribuído seu possível efeito imunológico.

É comum citações de que a proteína do sangue seja limitante em isoleucina já que as proteínas que estão em maior quantidade, cerca de 60%, são hemoglobinas e essas têm uma quantidade muito baixa de isoleucina. O soro, apesar de ser destituído de células vermelhas, visualmente é notável que houve hemólise de células e a composição de microelementos, através do ferro, confirma que há hemoglobina presente. GIANCOLA *et al.* (1997) também afirma que a BSA possui menos isoleucina e glicina que a média das proteínas.

A BSA e as globulinas são caracterizadas por possuírem baixo conteúdo de triptofano e metionina e alto de cistina e aminoácidos com cargas nas cadeias laterais como ácido aspártico, glutâmico, lisina e arginina (GIANCOLA *et al.*, 1997). A BSA possui alto teor de lisina, histidina e aminoácidos sulfurados, valores que superam em dobro o padrão utilizado. A GB, apesar de fornecer os aminoácidos essenciais acima da quantidade exigida, possui quase todos em valores inferiores ao do soro integral.

As diferenças na composição de aminoácidos podem ser explicadas pela presença no plasma de hemoglobina, fibrinogênio e outras proteínas envolvidas no processo de coagulação. O soro analisado, assim como o plasma, não sofreu diálise antes da análise de aminoácidos.

Os valores encontrados para a composição aminoacídica da BSA liofilizada e desidratada por *spray dryer* estão apresentados na Tabela 7, em comparação com o padrão da Food and Agriculture Organization (FAO/WHO/UNU, 1990).

Tabela 7. Composição de aminoácidos da fração BSA do soro de sangue bovino desidratadas por dois métodos diferentes.

Aminoácidos (g /100g de proteína)	Liofilizada	Spray	FAO ¹
Essenciais			
<i>Lisina</i>	12,40	12,72	5,8
<i>Treonina</i>	5,80	5,76	3,4
<i>Valina</i>	5,86	5,82	3,5
<i>Leucina</i>	11,68	12,12	6,6
<i>Isoleucina</i>	2,45	2,59	2,8
<i>Triptofano</i>	0,77*	0,63*	1,1
<i>Histidina</i>	4,28	3,86	1,9
<i>1/2 Cistina</i>	5,06	4,79	
<i>Metionina</i>	1,02	0,79	
<i>Sulf. totais</i>	6,08	5,58	2,5
<i>Tirosina</i>	5,05	4,98	
<i>Fenilalanina</i>	6,70	6,86	
<i>Arom. totais</i>	11,75	11,84	6,3
Não essenciais			
<i>Ac. Aspártico</i>	11,60	11,90	
<i>Serina</i>	4,98	4,60	
<i>Ac. glutâmico</i>	17,65	17,86	
<i>Prolina</i>	4,74	4,91	
<i>Glicina</i>	2,36	2,26	
<i>Alanina</i>	6,54	6,21	
<i>Arginina</i>	5,95	5,51	
EAE (%)	70 (Try)	57 (Try)	

¹ Padrão teórico da FAO/WHO/UNU, 1990 (aminoácidos indispensáveis para crianças de 2 a 5 anos de idade). * aminoácido mais limitante.

Pela comparação dos aminogramas da BSA (Tabela 7), foi possível observar que o processamento interferiu na composição de aminoácidos da amostra, tendo havido perda significativa de parte de alguns aminoácidos essenciais nas amostras desidratadas no *spray dryer*. Ambas as amostras, liofilizadas e secas em *spray*, foram limitantes em triptofano, em 30% e 43%

respectivamente, em relação ao padrão da FAO, 1990. As frações protéicas e mesmo o soro integral, por possuírem alto teor de lisina, solubilidade em água e conteúdo moderadamente alto em arginina são susceptíveis à rápida degradação enzimática (CHEFTEL, 1989).

3.3.4 Análise de minerais

Na Tabela 8 encontram-se os teores de minerais (macro e microelementos) das frações e do soro de sangue integral.

Tabela 8. Composição em minerais das frações protéicas do soro de sangue bovino e do soro integral.

Minerais* (mg/100g)	Soro do Sangue	BSA	GB	RDA ** (mg/dia)
Cálcio	87,69 ± 0,66	132,80± 1,04	10,22 ±0,35	800
Magnésio	22,04± 0,22	8,52 ±0,30	1,94 ±0,06	350
Sódio	3681± 64	44,86± 1,62	88,60± 4,27	400
Fósforo	94,50 ±1,13	73,43± 0,69	24,33± 0,32	800
Potássio	222,47 ± 2,22	11,45± 0,63	6,08 ±0,83	1600
Zinco	2,73± 0,06	5,13± 0,06	1,53± 0,14	15
Manganês	0,01± 0,00	0,10 ±0,00	0,01± 0,00	2-5
Ferro	4,99± 0,06	10,46± 0,09	5,04 ±0,05	10-15
Cobre	0,81± 0,02	0,39 ±0,01	1,29 ±0,04	1,5-3,0

*Média de três repetições analíticas ± estimativa de desvio padrão; ** Recommended Dietary Allowances - RDA, 1989. Homens, 25-50 anos.

Cada mineral possui funções específicas no corpo. São constituintes de ossos e dentes; no estado iônico em fluidos corpóreos são indispensáveis para a manutenção do equilíbrio ácido-base, atividades de integração do sistema nervoso e endócrino, etc. São essenciais em processos metabólicos vitais envolvendo troca gasosa e de energia e participam como componente de pigmentos do sangue, enzimas e compostos orgânicos em tecidos e órgãos. Os minerais reconhecidos como essenciais para as funções corpóreas são: cálcio, sódio, fósforo, magnésio, selênio, ferro, iodo, cobre, cobalto, zinco, flúor e cromo.

A BSA possui cálcio, zinco, manganês e ferro em quantidades superiores à GB e ao soro integral. A presença do ferro em concentração relativamente elevada indica que houve hemólise no processo de obtenção do soro e que a maior parte da hemoglobina foi precipitada com 80% de concentração salina. A concentração mais elevada de cálcio, zinco e ferro na BSA reflete uma maior capacidade dessa proteína de ligar íons divalentes. O soro tem um bom potencial como fonte de sódio, fósforo e potássio, sendo que o valor do sódio excede o recomendado em quase 10 vezes.

Digestibilidade “in vitro”

O resultado da digestibilidade para a BSA seca em *spray* e liofilizada e a GB liofilizada estão apresentadas na Tabela 9, em comparação com a caseína comercial.

Tabela 9. Digestibilidade *in vitro* das frações protéicas (BSA e GB) em comparação com a caseína comercial.

Proteína	Digestibilidade	PDCAAS (%)
BSA liofilizada	91,28 ± 8,99 ^a	80,0
BSA <i>spray</i>	91,79 ± 4,81 ^a	89,0
GB liofilizada	97,83 ± 3,52 ^a	90,0
GB <i>spray</i>	97,42 ± 1,88 ^a	91,0
Caseína*	99,00 ± 1,71 ^a	86,0

*Composição de aminoácidos retirados de BORGES, 2000.

O calor aplicado para secar o sangue para propósitos alimentares pode reduzir a proteína digestiva disponível principalmente através de modificações físico-químicas (desnaturação) e ligações com outras substâncias (reação de Maillard). O grau de dano dependerá da quantidade de calor aplicada e da extensão do aquecimento. Por isso diferenças entre processos industriais poderão influenciar a qualidade nutricional de alimento com sangue e explicar contradições

no desempenho de animais quando este subproduto é incluído em dietas de ruminantes (MARICHAL *et al.*, 2000).

Todas as proteínas apresentaram boa digestibilidade *in vitro* e não mostraram diferença estatística ($p > 0,05$) com a caseína, proteína de referência. O PDCAAS foi calculado em relação ao aminoácido mais limitante das proteínas, a isoleucina, para a GB e o triptofano, para a BSA. Portanto, as condições de secagem tanto em *spray* quanto em liofilizador não prejudicaram a digestibilidade destas proteínas.

3.4 Conclusões

As proteínas isoladas a partir do soro sangüíneo de bovinos com saturação para a GB de 50% de sulfato de amônio e para a BSA de 80%, apresentaram algumas diferenças na caracterização quanto ao processo de secagem, porém as duas frações mantiveram a concentração em proteínas. A BSA desidratada em *spray dryer* sofreu uma redução significativa na quantidade de lipídios, provavelmente porque o processo de secagem em *spray* envolve alta temperatura de entrada, diferentemente da liofilização.

As duas frações possuem quase todos os aminoácidos essenciais em quantidade superior à recomendada pela FAO/WHO (1990), sendo a BSA limitante em 13% de isoleucina e 27% em triptofano e a GB em 12% em isoleucina. A BSA possui alto teor de lisina, histidina e aminoácidos sulfurados, valores que superam em dobro o padrão utilizado. A GB, apesar de fornecer os aminoácidos essenciais acima da quantidade exigida, possui quase todos em valores inferiores ao do soro integral. Todas as proteínas apresentaram boa digestibilidade *in vitro* e não mostraram diferença estatística ($p > 0,05$) com a caseína. O PDCAAS foi calculado em relação ao aminoácido mais limitante das proteínas, a isoleucina nas duas frações.

A BSA possui cálcio, zinco, manganês e ferro em quantidades superiores à GB e ao soro integral. A presença do ferro em concentração relativamente elevada indica que houve hemólise no processo de obtenção do soro e que a maior parte da hemoglobina foi precipitada com 80% de concentração salina.

3.5 Referências bibliográficas

- AKESON, W.R.; STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 83, n. 3, p. 257-261, July, 1964.
- ANGELUCCI, E., MANTOVANI, D.B.M. Minerais em alimentos: manual técnico. Campinas: ITAL/SBCTA, 1986. 131p.
- AOAC-Association Of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**, 15.ed., Washington, 1990. v. 1-2.
- AVERY, C.G. Fractionation of blood by centrifugation. **Process Biochemistry**, Oxford, v.7, n.3, p.20-23, 1972.
- BLIGHT, E.C., DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.
- BORGES, Z. P. Avaliação nutricional de concentrados protéicos obtidos do leite bovino. Tese de mestrado, Campinas, UNICAMP, 2000.
- COHN, E.J. et al. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fraction of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. **Journal of the American Chemical Society**, Boston, v.68, parte 1, p.459-475, 1946.

- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias** Bioquímica-propiedades funcionales valor nutricional-modificaciones químicas; Trad. de Francisco López Capont. Zaragoza: Acribia, S. A., 1989. 346p.
- DAWSON, R.M.C; ELLIOTT, D.C; ELLIOTT, W.H; JONES, K.M. **Biochemical Research**, New York:Oxford University Press, 2^a ed, 1969, 654 p.
- DUARTE, R.M.T. Obtenção de frações protéicas do sangue bovino: composição, valor nutritivo e propriedades funcionais, Tese de mestrado, Campinas, UNICAMP, 1997.
- FAO FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Protein Quality Evaluation. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Roma, 1990.
- FAO/WHO/UNU. Energy and protein requeriments. Report of the Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report Series no 724, FAO/WHO and the United Nations University, Geneva, 1985.
- GIANCOLA, C; DE SENA, C.; FESSAS, D.; GRAZIANO, G.; BARONE, G. DSC studies on BSA denaturation. Effects of ionic strenght and SDS concentration. **International Journal of Biological Macromolecules**, Londres, v.20, n.1, p. 193-204, 1997.
- GÓMEZ-JUÁREZ, C.; CASTELLANOS, R.; PONCE-NOYOLA,T.; CALDERÓN, V.; FIGUEROA, J. Protein recovery from slaughterhouse wastes, **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.70, n.2, p.129-133, 1999.
- HALLIDAY, D.A. Blood - A source of proteins. **Process Biochemistry**, Oxford, v.8, n.12, p.15-17, 1973.
- HENLEY, E.C., KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.4, p.74-77, 1994.

- IMO INDUSTRIES INC. Analytical Instruments Division. ICP 2000 BAIRD. Spectrometer user's guide. Bedford, 1990.
- LAJOLO, F.M.; TIRAPEGUI, J. Proteínas e aminoácidos, em Ciências Nutricionais, DUTRA-DE-OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S., São Paulo, ed. Sarvier, 1998, 399p.
- LARA, F. O., RAMÍREZ, F., SANCHEZ, N. Estudio para obtencion de proteínas de sangre bovino. **Tecnologia de Alimentos**, v.12, jul-out, p.141-144, 1977.
- MARICHAL, M.J., CARRIQUIRY, M., PEREDA R., SAN MARTÍN, R. Protein degradability and intestinal digestibility of blood meals: comparison of two processing methods. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 88, p. 91-101, 2000.
- PORCELLI, M.C.; MARTINEZ, T.L.; EIRIS, A.A.; BURACHICK, M. Recoleccion higienica de sangre bovina. **NOTICITECA**, Buenos Aires v.12, n.72, 1982.
- RDA - Recommended Dietary Allowances. Subcommittee on the Tenth Edition of the RDAs, Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences. Washington: National Academy Press, 1989. 284p.
- RITO-PALOMARES, M.; DALE, C.; LYDDIATT, A. Generic application of an aqueous two-phase process for protein recovery from animal blood. **Process Biochemistry**, Oxford, v.35, p.665-673, 2000.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos propriedades de degradações – modificações**. São Paulo: Varela, 1996, 517p.
- SHIH, Y.; PRAUSNITZ, J.M.; BLANCH, H.W. Some characteristics of protein precipitation by salts. **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, n.10, p. 1155-1164, 1992.

SLAVIN, S, PETERSON, G.E., LINDAHL, P.C. Determination of heavy metals in meats by absorption spectroscopy. **Atomic Absorption Newsletter**, Norwalk, v.14, n.3, p.57-59, 1975.

SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, Easton, v. 30, n. 7, p. 1190-1206, 1958.

SPIES, J. R. Colorimetric procedures for amino acids. **Methods in Enzymology**, v. 3,p. 468 - 471, 1957.

TANAKA, K. Fracionamento do plasma bovino para isolamento da BSA e sua liofilização. São Paulo, 1987. Dissertação (Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP.

Capítulo 4. Propriedade hidrofílica- solubilidade das frações protéicas albumina (BSA) e globulina (GB)

Resumo

As propriedades hidrofílicas das frações protéicas isoladas a partir do soro de sangue bovino foram analisadas através da solubilidade em diversas condições de pH, temperatura e concentração salina. A GB apresentou-se, em função do pH, com alta solubilidade nos extremos da faixa estudada (pH 3 e 8), sendo que a região isoelétrica (pHs 5 a 6) foi bem marcada pela redução de solubilidade a 60%. O sal monovalente, cloreto de sódio, não teve seu efeito predominante sobre o pH com baixa concentração (0,1M). Induziu a melhora da solubilidade, principalmente na região isoelétrica, com concentração de 0,15M e a partir de então, o efeito do sal superou a força eletrostática exercida pelo pH mantendo a solubilidade da GB constante em 82%. A BSA mostrou alta solubilidade (90%) em todas as concentrações salinas analisadas (0, 0,1; 0,15; 0,2 M) e o pH não teve influência em seu comportamento. O aquecimento brando (35°C) da solução protéica de BSA e GB causou um aumento na solubilidade. O método de secagem por spray dryer interferiu pouco nos resultados de solubilidade.

4.1 Introdução

As proteínas têm sido usadas na indústria alimentícia, pelo fato de apresentarem excelentes propriedades funcionais como agentes emulsificantes, de ligar e reter água, formar espuma e de geleificação. O estudo da funcionalidade não é simples pois freqüentemente a estrutura nativa da proteína é modificada ao transformar-se no produto final.

A solubilidade da proteína é uma propriedade importante para a utilização de suas funções em sistema alimentar, sendo extremamente crucial quando expressa em função do pH, que afeta a natureza e distribuição de cargas da proteína e cada alimento apresenta diferentes valores de pH. Essa propriedade depende grandemente do número e arranjo de cargas nas moléculas, que por sua vez dependerá da composição dos aminoácidos, particularmente do número de resíduos ácidos (aspartil e glutamil) e básicos (histidil, arginil e lisil) (SGARBIERI, 1998).

A solubilidade protéica também influencia outras propriedades funcionais, porque devem estar solúveis para que possam interagir com outros componentes do sistema, como no caso da capacidade de formação de espuma de interagir com o ar, ou com o óleo, no caso da formação de emulsão. RAEKER & JOHNSON (1995) observaram que as proteínas do plasma e as proteínas com hidrofobicidade de superfície e solubilidade mais alta têm um maior poder emulsificante comparado às proteínas do ovo.

Um dos fatores mais influentes sobre a solubilidade é o pH. As variações de pH ao modificar a ionização da molécula protéica, alteram as forças atrativas e repulsivas entre as proteínas e a capacidade destas últimas em associar-se com a água. Em geral, no ponto isoelétrico as interações proteína-proteína são máximas e as proteínas associadas repelem-se entre si, manifestando uma hidratação mínima.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Materiais

Foram utilizadas como amostras para realização dos ensaios de propriedades funcionais, albumina (BSA) e globulina (GB) obtidas por precipitação seletiva, liofilizadas e desidratadas em *spray dryer*. Os processos de obtenção e secagem foram descritos anteriormente, no capítulo 3.

4.2.2 Solubilidade

A curva de solubilidade da proteína foi obtida utilizando-se basicamente o método de MORR et al. (1985). A única modificação consistiu na variação do pH da solução. O ensaio de solubilidade foi feito em duplicata e as determinações de nitrogênio solúvel em triplicatas.

Suspendeu-se 500mg das amostras em 50 mL de solução salina a 0,1M, ajustando-se os pHs a diferentes valores compreendidos na faixa de 3 a 8, com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. As suspensões foram agitadas em agitador magnético por uma hora à temperatura ambiente, fazendo-se num período de 30min o controle de pH. Após a centrifugação e posterior filtração das suspensões em papel filtro qualitativo Whatman n^o.1, a proteína solúvel (%SP) no sobrenadante foi determinada pelo método de Kjeldhal (AOAC, 1990) e calculada como segue:

$$\% PS = \frac{\text{concentração protéica no sobrenadante } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \cdot 50}{\text{peso amostra (mg)} \cdot \frac{\text{conteúdo de proteína na amostra (\%)}}{100}} \cdot 100$$

Com os melhores valores de solubilidade em função do pH foi repetido o ensaio de solubilidade variando-se a concentração de sal cloreto de sódio em 0; 0,15 e 0,2 M, e a temperatura do banho em 25° (ambiente controlada); 35°; 45°C.

4.3 Resultados

As propriedades de hidratação das frações protéicas isoladas do soro de sangue foram verificadas através da solubilidade e variando-se os fatores de influência principal: temperatura, pH e concentração salina, usando-se o sal cloreto de sódio. As proteínas podem ser precipitadas por perturbações causadas na solução pelo pH, força iônica e temperatura (ENGLARD & SEIFTER, 1990).

A solubilidade reflete a organização estrutural da molécula, indicando a extensão de desnaturação e permitindo ou não a utilização das proteínas em um sistema alimentar, mesmo porque dela dependem as propriedades de superfície como a capacidade de formação de espuma e de emulsão. As curvas obtidas nas Figuras 8 e 9 verificam a influência do pH desde muito ácido (pH 3) até condições ligeiramente alcalinas (pH 8), para a GB e BSA, respectivamente.

A solubilidade tende ser maior, em geral, em regiões alcalinas e ácidas por causa da alteração das cargas elétricas em função do pH. Se o pH altera o balanço das cargas intra e intermoleculares, acima e abaixo do ponto isoelétrico as proteínas possuem carga líquida negativa e positiva respectivamente, e com isso há um aumento na solubilidade. No pI , a carga líquida é nula, prevalecendo as forças de atração entre as moléculas protéicas, tendendo à precipitação (LOURENÇO, 2000).

A GB em solução aquosa sem adição de sal mostrou um comportamento frente às mudanças de pH, típicos de uma curva geral de solubilidade protéica, isto é, com mínimos de solubilidade em regiões que provavelmente possam indicar o ponto isoelétrico da proteína. Esta diminuição acentuou-se em pH 5,5.

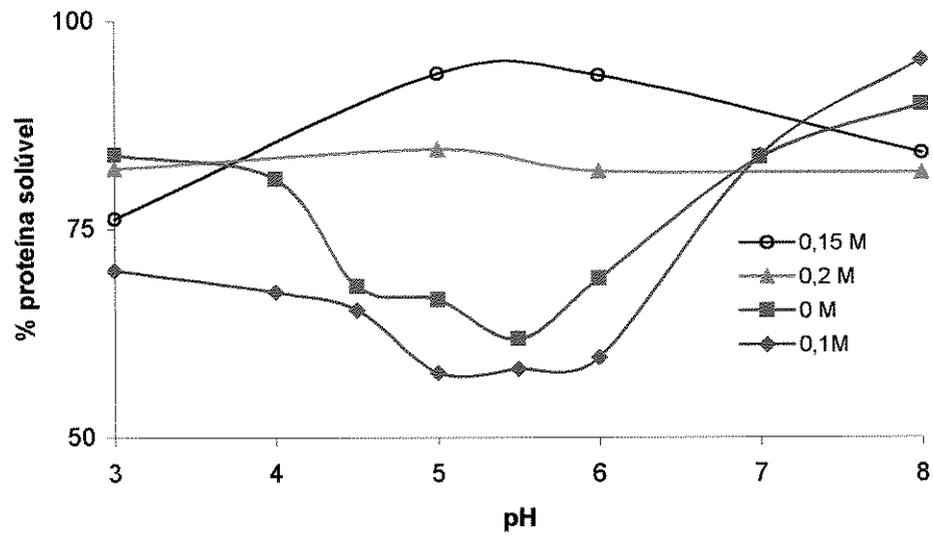


Figura 8. Curva de solubilidade de solução a 1% de GB com a variação da concentração de sal, em função do pH.

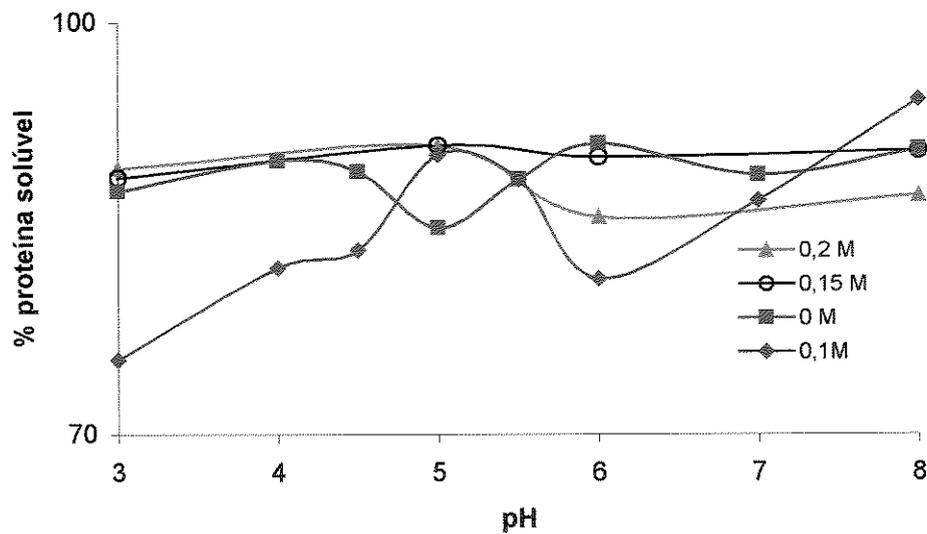


Figura 9. Curva de solubilidade de solução 1% de BSA com variação do pH e da concentração de sal.

Observando-se a Figura 9, nota-se que a BSA possui alta solubilidade, em todas as concentrações salinas analisadas (0, 0,1; 0,15; 0,2 M) e que o pH não teve tanta influência em seu comportamento, como no caso da GB. A principal razão pela alta solubilidade da BSA é possuir elevada quantidade de carga total, aproximadamente 85 grupos ionizáveis por mol de proteína em pH 7 (GIANCOLA *et al.*, 1997), isto permite que haja uma solvatação da água por meio das pontes de hidrogênio.

Mas a solubilidade é um balanço global entre a atração intermolecular das proteínas e a relação proteína-solvente. Por isso, se as condições de pH e concentração salina adotada não são suficientes para alterar significativamente o comportamento da BSA em solução, indica que a solubilidade desta proteína depende intrinsecamente de sua conformação e composição estrutural. Sabe-se que a BSA possui uma estrutura compacta e globular além de 17 pontes dissulfeto que podem estar favorecendo sua estabilidade.

A adição de cloreto de sódio à solução de GB, numa primeira concentração (0,1M) provocou uma pequena redução de solubilidade em praticamente todos os pHs, sendo mais acentuada em pH 3. Tal redução a pH 3 pode ser explicada pela capacidade dos íons cloretos ligarem-se às proteínas carregadas positivamente pelo excesso de íons H^+ em solução e com isso, haver uma tendência ao equilíbrio de cargas na molécula, diminuindo a repulsão entre elas e impedindo a hidratação.

Aumentando-se a concentração salina para 0,15 M, notou-se uma melhora na solubilidade de 60% na região isoelétrica, comparativamente aos valores obtidos para a curva com 0,1 M de concentração de cloreto de sódio. A curva de solubilidade obtida com globulinas em solução salina 0,2 M mostrou-se indiferente à variação de pH, mantendo-se em torno de 82% de proteína solúvel. Parece que nesta concentração o sal superou o efeito do pH não permitindo sua ação na estrutura protéica.

PENTEADO *et al.* (1979) observaram o comportamento das GB liofilizadas, obtidas de maneira semelhante, em relação à variação de pH e constataram um menor índice de solubilidade entre pHs 5 e 6, sendo os valores de mínimo e máximo encontrados como 50 e 98%, aproximadamente.

A curva da BSA com adição de sal à concentração de 0,1 M apresentou-se um pouco mais distinta em relação às demais, pelo fato de aumentar a solubilidade em pH 5 comparando-se com a curva obtida sem a adição de sal, e por apresentar mínimos de solubilidade de pH 3 a 4,5 e 6 a valores mais elevados no pH 8, onde atingiu o máximo de solubilidade em relação às demais curvas.

Sabe-se, que o balanço das interações hidrofóbicas e eletrostáticas podem ser manipulados não somente pelo pH e força iônica, mas também pela natureza do sal usado (OSHODI & OJOKAN, 1997). Portanto sais divalentes como o cloreto de cálcio, poderão apresentar resultados bem diferentes quando comparados aos formados de íons monovalentes.

As Figuras 10 e 11, apresentam a influência da temperatura na solubilidade em soluções salinas (0,1 M) contendo 1% da proteína na faixa de pH 3 a 8. As condições de temperatura usadas (25, 35 e 45 °C) são brandas, com exceção de 45 °C que pode, eventualmente, causar alguma desnaturação protéica.

Percebe-se que a BSA e a GB possuem comportamentos bem distintos frente ao pH mas o aumento de temperatura provoca um aumento de solubilidade para as duas frações. Apesar da BSA possuir alta solubilidade em toda a faixa de pH, a temperatura ambiente mostrou ser pouco menos solúvel que com aquecimento de 35°C. Já a GB em temperatura ambiente possui baixas solubilidades principalmente na região isoelétrica em torno de 60-70%. A elevação de temperatura, neste caso, causou um sensível aumento na solubilidade em todos os pHs, exceto em pH 5 onde a melhora foi pequena.

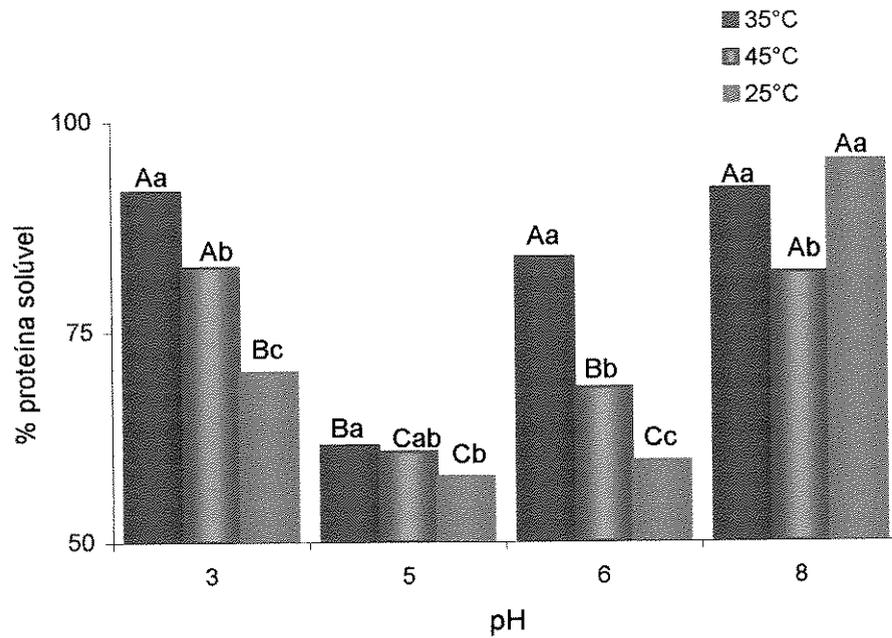


Figura 10. Solubilidade da GB em solução 0,1M de NaCl, com variação da temperatura e pH. Letras minúsculas comparam amostras com temperaturas diferentes e mesmo pH e letras maiúsculas, entre amostra com pHs diferentes e mesma temperatura. $P < 0,05$.

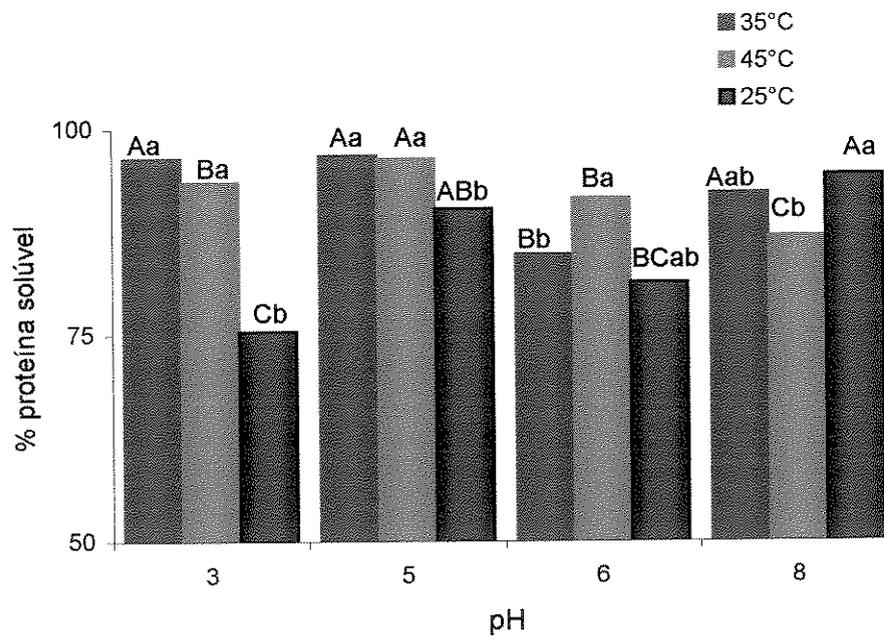


Figura 11. Solubilidade da BSA em solução 0,1M de NaCl, com a variação de temperatura e pH. Letras minúsculas comparam amostras com temperaturas diferentes e mesmo pH e letras maiúsculas, entre amostra com pHs diferentes e mesma temperatura. $P < 0,05$.

A solubilidade da GB, nas três temperaturas estudadas, mostrou pontos de mínima solubilidade em pH 5 e máxima em pH 8. O aquecimento a 35°C melhorou a solubilidade da GB em todos os pHs, inclusive na faixa de pH da região isoelétrica (5-6), porém o aumento da temperatura para 45°C, apesar de aumentar a solubilidade da amostra comparando-se com a temperatura ambiente, provocou uma redução significativa ($p < 0,05$) na solubilidade frente à curva de 35°C. A redução de solubilidade com o aumento da temperatura provavelmente foi devido à desnaturação de algum tipo de GB que compõe esta fração.

Em relação à BSA (Figura 11), nota-se que o aumento da temperatura melhorou a solubilidade, principalmente em pH 3 (~20%). Porém, diferentemente da GB, a temperatura de 45°C não reduziu a solubilidade comparando-se à curva de 35°C, tendo provocado uma redução significativa ($p < 0,05$) porém pequena, em pH 8 comparando-se à curva da temperatura ambiente. Em pH 6, a temperatura não influenciou a solubilidade.

A estrutura multidomínios da BSA é responsável pelo comportamento anômalo da proteína sob condições desnaturantes. Os domínios da BSA são dissimilados em hidrofobicidade, carga de rede e sítios ligantes e cada um tem uma função distinta da outra. A BSA liga ácidos graxos, outros lipídios e saborizantes que podem estabilizar a molécula contra a desnaturação térmica. O ponto de transição térmica da BSA é 65°C, apesar da maioria das moléculas de BSA romperem suas ligações com os ácidos graxos com aquecimento acima de 60°C em pH 7 resultando em sua desnaturação. (AOKI *et al.*, 1978).

Comparando-se a BSA e a GB (Figura 12) na ausência de sal, observa-se que apresentam comportamentos bem diferentes em relação a solubilidade quando em função do pH. A BSA quase não sofreu influência da variação de pH enquanto que a GB apresentou um mínimo de solubilidade entre os pHs 5 e 6. Isto era esperado já que suas estruturas moleculares e composições são diferentes.

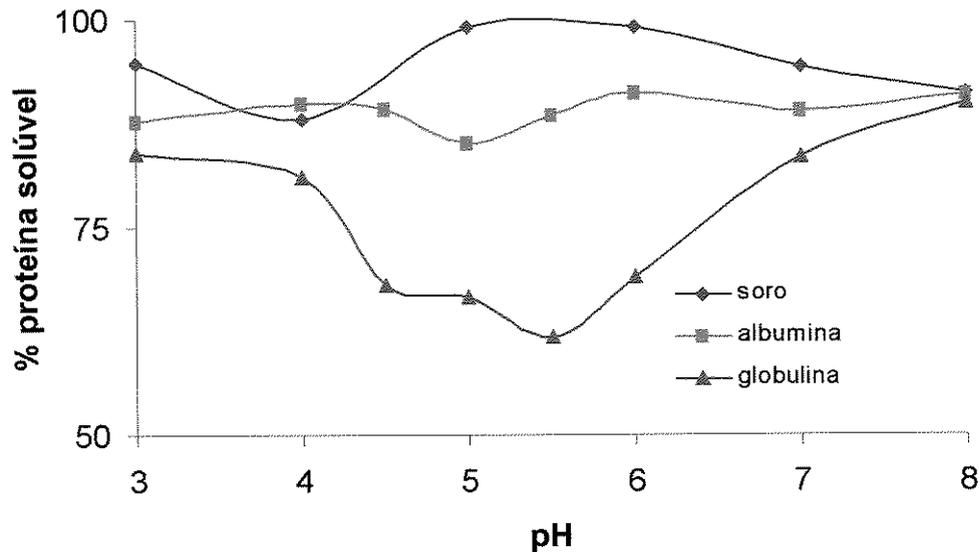


Figura 12. Curva de solubilidade do soro sangüíneo e das frações BSA e GB com variação de pH sem adição de NaCl.

O soro integral apresentou um mínimo de solubilidade de 90% em pH 4 e um máximo entre os pHs 5 e 6. A maioria dos trabalhos consultados da literatura, que caracterizaram as proteínas do sangue bovino, utilizou como matéria-prima o plasma, e não o soro. O plasma exige a adição de um anticoagulante e não exclui o fibrinogênio da solução, por isso resultados como o de TYBOR *et al.* (1975) que mostra um mínimo de solubilidade do plasma de 75% em pH 4, ou de PENTEADO *et al.* (1979) em pH 5, não podem ser usados como comparação com o soro, podendo esta diferença de solubilidade no pH supostamente isoelétrico ser devido a presença de proteínas como o fibrinogênio.

O soro apresentou-se mais solúvel na faixa de pH onde a BSA e a GB tiveram menor solubilidade provavelmente pelo fato de não ter sido dialisado, e com isso, a solubilidade mais elevada possivelmente se deva à influência dos sais contido em solução na concentração fisiológica. A ausência de diálise, impede que se analise a influência isolada do pH sobre as proteínas.

A Figura 13 apresenta as curvas de solubilidade da GB desidratada por spray dryer e liofilização, e mostra o efeito do método de secagem na solubilidade da proteína. As amostras desidratadas em *spray* tenderam a perder solubilidade nos pHs ácidos (3-4) e alcalinos (7-8).

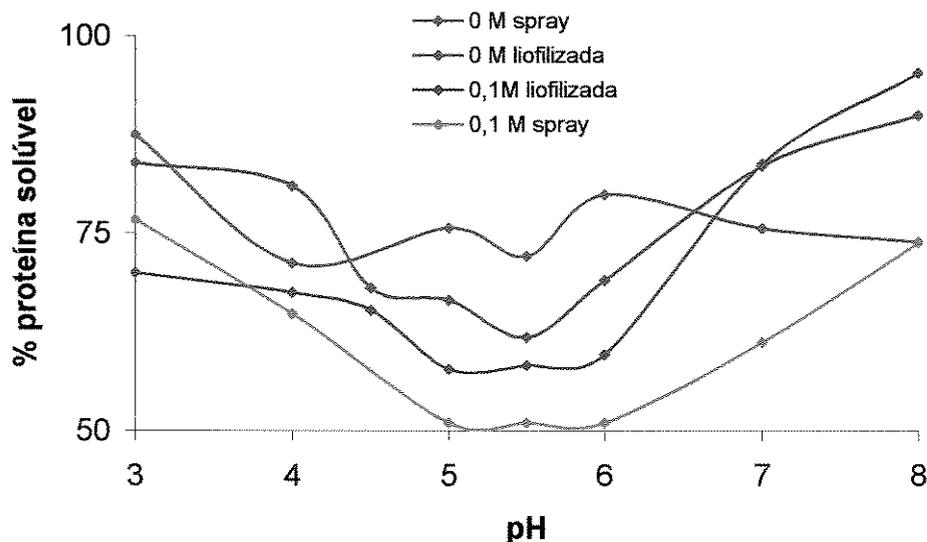


Figura 13. Curva de solubilidade de 1% de GBs liofilizadas e secas em spray dryer com a variação da concentração de sal e pH.

Observa-se que amostras com maiores solubilidades foram aquelas cuja solução foi feita em água, ou seja, na ausência de cloreto de sódio. Apesar do método de secagem não alterar o efeito do sal sobre as amostras, na região isoelétrica (4,5 – 6,5), o sal mostrou ter mais influência sobre a amostra desidratada em *spray* que na liofilizada, provavelmente por alguma alteração estrutural que o processo de secagem possa ter causado.

Nos pHs onde a solubilidade foi reduzida em presença de sal pode ter ocorrido uma competição entre as proteínas do plasma e os íons pela água (“salting-out”), promovendo uma agregação das proteínas e causando o decréscimo da solubilidade (O’RIORDAN *et al.*, 1989).

4.4 Conclusões

A solubilidade da GB comportou-se como uma curva típica de proteína, possuindo baixas solubilidades em pHs próximos ao pH isoelétrico e maiores em pHs extremos. A adição de sal (0,1M) provocou diminuição da solubilidade e, em pH 3, essa redução foi mais acentuada. A curva feita com concentração salina de 0,2 M mostrou pouca influência do pH e manteve-se na faixa de 82% de solubilidade. Nesta concentração, parece que o sal superou o efeito do pH, fazendo com que este deixasse de agir na estrutura da proteína.

A BSA mostrou alta solubilidade (90%) em todas as concentrações salinas analisadas (0, 0,1, 0,15, 0,2M) e o pH teve menor influência em seu comportamento. Sua estabilidade deve-se à estrutura compacta e globular, e às pontes dissulfeto. A BSA e a GB possuem comportamentos bem distintos frente ao pH mas o aumento de temperatura provoca um aumento de solubilidade para as duas frações.

O método de secagem interferiu pouco nos resultados de solubilidade. As amostras com maiores solubilidades, em relação ao mesmo método de secagem, foram aquelas cuja solução foi feita em água, ou seja, na ausência de cloreto de sódio. Além disto, a amostra desidratada em spray mostrou ser mais solúvel na região isoelétrica que a amostra liofilizada sem a adição de sal.

4.5 Referências Bibliográficas

AOAC-Association Of Official Analytical Chemists, **Official methods of analysis** 15.ed. Washington, 1990. v. 1-2.

AOKI, K.; SATO, K.; NAGAOKA, S.; KAMADA, M.; HIRAMATSU, K. Heat denaturation of BSA in alkaline pH region. **Biochimica and Biophysica Acta**, *Ámsterdam*, v. 328, p.323-333, 1978.

- ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques, in: **Methods in Enzymology-Guide to protein purification**, DEUTSCHER, M.P. London: Academic Press, v. 182, 1990.
- GIANCOLA, C, DE SENA, C; FESSAS, D; GRAZIANO, G; BARONE, G. DSC studies on BSA denaturation. Effects of ionic strength and SDS concentration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.20, p. 193-204, 1997.
- LOURENÇO, E.J. Tópicos de proteínas de alimentos. Jaboticabal: Funep, 2000, 344p.
- MORR, C.V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E.; REGENSTEIN, J.M.; VAN BUREN, J.P.; KILARA, A.; LEWIS, B.A.; MANGINO, M.E. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.6, p. 1715-1718, 1985.
- O'RIORDAN, D.; MORRISSEY, P.A.; MULVIHILL, D.M. The effect of neutral salts and chemical reagents on the solubility and viscosity of plasma protein solutions. **Sciences des Aliments**, Paris, v.9, n.3, p.463-472, 1989.
- OSHODI, A.A.; OJOKAN, E. Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate. **Food Chemistry**, Barking, v.59, n.3, p.333-338, 1997.
- PENTEADO, M.V.C.; LAJOLO, M.F.; SANTOS, N.P. Functional and Nutritional Properties of Isolated Bovine Blood Proteins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.30, p.809-815, 1979.
- RAEKER, M.O; JOHNSON, L.A. Thermal and functional properties of bovine blood plasma and egg white proteins. **Journal of Food Science**, v.60, n.4, p. 685-690, 1995.
- SGARBIERI, V.C. Propriedades Funcionais de Proteínas em Alimentos, **Bol SBCTA**, v.32, n.1, p.105-126, 1998.

TYBOR, P.T.; DILL, C. W.; LANDMAN, W.A. Functional properties of protein isolated from bovine blood by a continuous pilot process. **Journal of Food Science**, Chicago, v.40, n.1, p.155-159, 1975.

Capítulo 5. Propriedades de superfície: espuma e emulsão das frações albumina (BSA) e globulina (GB)

Resumo

As frações albumina (BSA) e globulina (GB), liofilizadas e desidratadas em spray, foram avaliadas quanto sua capacidade de formação e estabilidade de espuma e emulsão. A formação e estabilidade da espuma foram medidas variando-se a concentração de proteína em 1, 3, 5 e 7% e escolheu-se uma concentração para o estudo do efeito do pH sobre esta propriedade. As proteínas do sangue tiveram formação de espuma similar à da proteína da clara de ovo. A BSA, apesar de mesma CFE, forma uma espuma menos estável que a GB. As diferenças encontradas nos métodos de secagem são relevantes, tendo a secagem em spray, melhorado as propriedades funcionais estudadas ($p < 0,05$), com exceção da formação de espuma da GB. A capacidade de emulsificação das proteínas foi medida variando-se o pH e a força iônica, mantendo-se fixa a quantidade de proteína utilizada. Comparou-se os resultados, com o concentrado protéico de soro de leite. A GB apesar de não possuir boa capacidade emulsificante em relação às demais proteínas estudadas, foi a amostra que obteve melhor estabilidade.

5.1 Introdução

As proteínas são muito flexíveis quanto as suas utilizações. Na área médica, utiliza-se uma variedade de proteínas como padrões, antídotos, antígenos. Na indústria de materiais são empregadas na formulação de colas, fitas adesivas, papéis, emulsões fotográficas, etc. Nos alimentos podem ser usadas para melhorar as características físicas ou o valor nutricional.

As propriedades funcionais são essenciais em qualquer produto alimentício por basear-se em princípios básicos que alteram suas características, como a solubilidade, a capacidade de formação de emulsão, espuma e gel.

As proteínas apresentam comportamentos diferentes umas das outras por razões físico-químicas como composição, estrutura, carga elétrica e por interações que envolvem os componentes do meio em que estão.

Neste capítulo verificou-se as propriedades funcionais tecnológicas, mais especificamente as propriedades de superfície (capacidade de formação de espuma e de emulsão) das duas frações do soro de sangue bovino liofilizadas e desidratadas em *spray dryer*, também para se comparar a influência dos métodos de secagem.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Materiais

Foram utilizadas como amostras para realização dos ensaios de propriedades funcionais, BSA, GB obtidas por precipitação seletiva, liofilizadas e desidratadas em *spray dryer*. Os processos de obtenção e secagem foram descritos anteriormente. Como padrão de comparação foi usado a proteína da clara do ovo (PCO), para a formação de espuma, e concentrado protéico de soro de leite (CSD), para a formação de emulsão.

5.2.2 Capacidade de formação de espuma e estabilidade da espuma

A capacidade de formação de espuma foi determinada de acordo com MOHANTY et al. (1988) comparando-se com a BSA de ovo comercial desidratada em *spray dryer* (SOHOVOS). As dispersões foram preparadas com 1, 3, 5 e 7% de amostra protéica completando volume para 50mL de solução e agitadas em batedeira Walita, mod. RI-3164, a 1100 rpm (máxima velocidade) por cinco minutos. A espuma formada foi rápida e cuidadosamente transferida, com o auxílio de uma espátula, para proveta de 500 mL. O volume inicial de espuma formada foi registrado e a porcentagem de espuma em relação ao volume original da solução foi calculada pela fórmula:

$$\% FE = \frac{\text{Volume espuma inicial (mL)}}{\text{Volume original da solução proteica (mL)}} \cdot 100$$

A estabilidade da espuma foi analisada pelo método descrito por PATEL et al. (1988) e pela cinética de desestabilização, usando o modelo matemático proposto por ELIZALDE et al. (1991), onde a espuma foi mantida na proveta por 60 minutos e foram medidos simultaneamente, o volume da espuma e do líquido drenado com o decorrer do tempo. Nos primeiros 10 minutos essas medidas foram tomadas de minuto em minuto pois a desestabilização maior ocorreu principalmente neste intervalo. Depois tomou-se as medidas de 10 em 10 minutos até que se completasse uma hora. As fórmulas utilizadas para determinar a estabilidade da espuma e a quantidade de líquido drenado estão abaixo relacionadas.

$$\% EEs = \frac{\text{Volume residual da espuma após 30 e 60 min (mL)}}{\text{Volume inicial da espuma incluindo o volume do líquido (mL)}} \cdot 100$$

$$\% LD = \frac{\text{Volume de líquido drenado após 30 e 60 min (mL)}}{\text{Volume original da solução de proteína (mL)}} \cdot 100$$

5.2.3 Propriedades de emulsificação

A capacidade de emulsificação foi determinada pelo método de DE KANTEREWICZ et al. (1987), em que dispersões a 1% de amostra protéica foram combinadas com óleo de soja, em diferentes proporções, num volume total de 50 mL até que ocorresse a quebra da emulsão (em 35 água/15 óleo, para as duas proteínas). A proporção anterior à quebra foi usada, e antes de iniciar a adição de incrementos de óleo através de uma bureta, a mistura foi agitada a 10.000 rpm por um minuto em um homogeneizador ultra-turrax T-25, IKA® - LABORTHECHNIK e mantida em banho de gelo.

Com a quebra da emulsão, visualizada pela mudança da consistência da mistura, suspendeu-se a incorporação de óleo e o volume de óleo usado na bureta mais o volume adicionado inicialmente, foram usados para determinar a capacidade emulsificante de cada proteína, calculada pela máxima quantidade de óleo adicionada por grama de proteína, em mililitros, até o ponto de inversão.

A estabilidade da emulsão foi feita utilizando-se três métodos que analisam diferentes mecanismos que agem para desestabilizá-la. O primeiro, de DAGORN-SCAVINER *et al.* (1987), estuda a cinética da floculação e cremeamento da emulsão e permite o cálculo das constantes de velocidade de desestabilização e parâmetros vinculados com a hidratação da película interfacial. Consistiu na homogeneização de uma mistura composta por 30 mL de solução protéica (0,5 mg/mL) e 10 mL de óleo durante 30 segundos, a 20.000 rpm em homogeneizador ultra-turrax T-25, IKA® - LABORTHECHNIK.

Antes de completar os 30s de agitação, foi adicionado uma solução alcoólica corante (sudam) para facilitar a visualização da separação de fases, e a emulsão foi imediatamente transferida para uma proveta de 10 mL. A partir deste momento passou-se a contar o tempo e foi tomada nota do volume de fase cremeada (superior) e aquosa (inferior) separada. A cinética deste processo foi

medida pelo volume da fase aquosa formada *versus* tempo. O volume de equilíbrio, só foi contado ao término de 24 horas.

Os parâmetros usados para quantificar a estabilidade da emulsão são V_e (volume de equilíbrio) e $\phi = 2,5/10 - V_e + 2,5$ (fração óleo emulsionado, assumindo que com $t \rightarrow \infty$, todo o óleo inicial estivesse na fase cremada) e as constantes de velocidade das primeiras etapas de desestabilização. Uma emulsão instável possui características de altas constantes cinéticas e ϕ tendendo a 1.

Em outro método, a coalescência da emulsão foi avaliada em um intervalo de tempo determinado (PEARCE e KINSELLA, 1978). A emulsão feita a partir de 10 mL de óleo com 30 mL de solução contendo 10 mg de amostra /mL de tampão fosfato 0,1M, pH7, foi diluída 250 vezes em solução estabilizadora. Tal solução é composta de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7, 0,1% SDS e 0,1M de NaCl. As diluições foram feitas em duas etapas (1/10 e 1/25), e foi tomado o cuidado para que o tempo necessário para cada etapa do processo (formação, diluição e leitura) fosse o mesmo em todas as amostras. A leitura da absorbância em Espectrofotômetro HITACHI U-2000, a 500nm, foi feita imediatamente após a diluição e comparou-se com a da amostra em repouso por 4 horas.

O índice de estabilidade da emulsão (IEE) foi a medida adotada para qualificar a estabilidade da emulsão formada, quanto à coalescência. Ele é uma diferença entre a turbidez inicial (após atingir o estado estacionário, ou seja, quando começar a ficar estável, desprezando os primeiros minutos) e a turbidez depois de um intervalo de tempo determinado. Observe a equação abaixo:

$$IEE = \frac{T \cdot \Delta t}{\Delta T}$$

onde T é a turbidez inicial (2,303.Absorbância /1,05), e repare que o valor de IEE para que possa ser comparado com outros autores, deve apresentar o mesmo intervalo de tempo, e que a variação deste índice depende somente da diferença de turbidez ΔT . Quanto menor essa diferença, maior o IEE, indicando

que a emulsão é mais estável pois não houve diferença entre as fases lidas, naquele intervalo de tempo.

O cremeamento e a floculação, ambos processos de desestabilização da emulsão foram medidos utilizando-se o método descrito por ACTON & SAFLE (1970). Consistiu na homogeneização de uma mistura composta por 25 mL de solução protéica (1 mg/mL) e 25 mL de óleo durante 3 minutos, a 10.000 rpm/min em homogeneizador ultra-turrax T-25, IKA® - LABORTHECHNIK.

Assim que a emulsão ficou pronta, colocou-se 10 mL em dois tubos de ensaio que foram mantidos em repouso à temperatura ambiente por 24 horas. A umidade foi determinada em alíquotas de 5mL da emulsão inicial e das extraídas do fundo do tubo de ensaio, seguindo AOAC (1990). A estabilidade da emulsão foi calculada como segue:

$$\%EE = \frac{100 - U^{24\text{ hora}}}{100 - U^{\text{original}}} \times 100$$

$U^{24\text{ horas}}$ = porcentagem de umidade da emulsão após 24 horas de repouso

U^{original} = porcentagem de umidade da emulsão imediatamente após o preparo

5.3 Resultados

As propriedades funcionais foram feitas primeiramente nas amostras liofilizadas, estudando-se um número maior de variáveis e variações, de modo a conhecer o comportamento da proteína. Depois os métodos de determinação de solubilidade, capacidade de formação de emulsão e espuma foram refeitos em alguns pontos, principalmente em função do pH, para comparar o efeito do método de secagem na propriedade funcional em questão.

5.3.1 Propriedades espumantes

As propriedades espumantes das frações protéicas obtidas, em comparação com a proteína da clara de ovo (PCO), foram analisadas através do *overrun* e da estabilidade do volume de espuma (%EEs) após os períodos de 30 e 60 minutos.

A capacidade de formação de espuma da BSA e GB comparada à PCO, em várias concentrações de amostra, está apresentada na Figura 14 em volume de espuma formada por volume de solução inicial, ou seja, qual o aumento (em %) do volume de material em relação à quantidade de solução que se possuía inicialmente. As duas amostras do sangue apresentam muito boa capacidade espumante, idênticas à da proteína da clara de ovo, exceto com concentração de 1% de amostra protéica, onde se mostraram superiores.

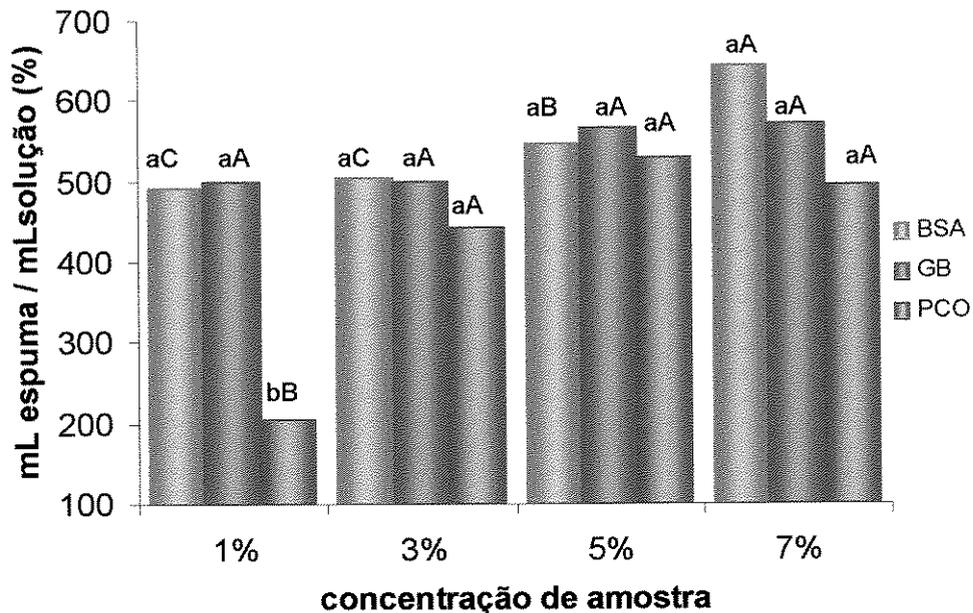


Figura 14 Formação de espuma das frações protéicas de sangue bovino e da BSA da clara de ovo (PCO) com variação da concentração de proteína. Letras minúsculas comparam amostras diferentes com mesma concentração e letras maiúsculas, entre a mesma amostra com concentrações diferentes. Diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

A capacidade de formação de espuma da BSA foi crescente com a quantidade de proteína presente, porém a concentração de GB apresentou-se indiferente na formação da espuma, não resultando melhora com o aumento da concentração de proteína na faixa estudada.

A Figura 15 mostra a estabilidade da espuma obtida pelas frações protéicas após 30 minutos de formada e indica que apenas a BSA mostrou aumento de estabilidade ($p < 0,05$) em relação à concentração. A BSA revelou uma estabilidade muito alta sendo que em concentrações acima de 3%, ficou em torno de 95%, ou seja, não houve alteração do volume da espuma inicial. Após uma hora de repouso (Figura 16), a redução do volume residual apresentou-se maior para

concentração de 1%, cerca de 22%, e essa diferença diminuiu para 10% nas demais concentrações.

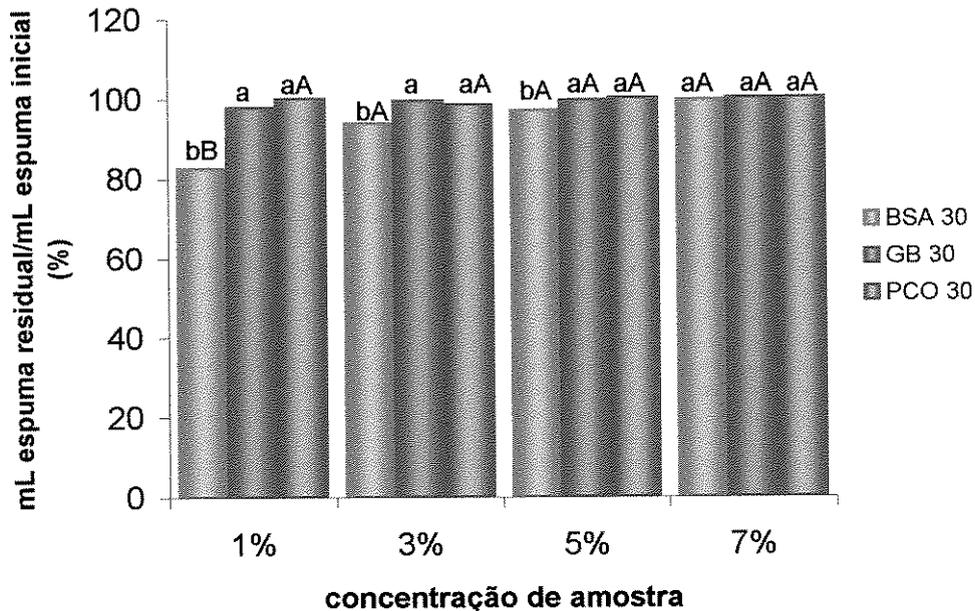


Figura 15. Estabilidade da espuma formada pela BSA, GB e PCO após 30 minutos, variando-se a concentração de proteína. Letras minúsculas comparam amostras diferentes com mesma concentração e letras maiúsculas, entre a mesma amostra com concentrações diferentes. Diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

As proteínas estabilizam as espumas através da adsorção na interface gás/líquido, o que diminui a tensão interfacial provocando gradientes de tensão e resultando na estabilização da espuma (CLARKSON *et al.*, 2000). A formação de espumas estáveis não se deve à formação de ligações dissulfeto intermolecular mas à formação de uma rede por outras interações não-covalentes como as hidrofóbicas (DOI *et al.*, 1988).

A espuma formada pela GB mostrou boa estabilidade a 30 minutos permanecendo na faixa de 98% e não demonstrou diferença estatística ($p > 0,05$) entre as concentrações para um mesmo tempo. A redução da estabilidade da espuma após 60 minutos de repouso foi muito pequena, mostrando que a GB

apesar de não possuir capacidade de formação de espuma melhor que a BSA, apresenta ótima estabilidade mesmo após 1 hora de preparação.

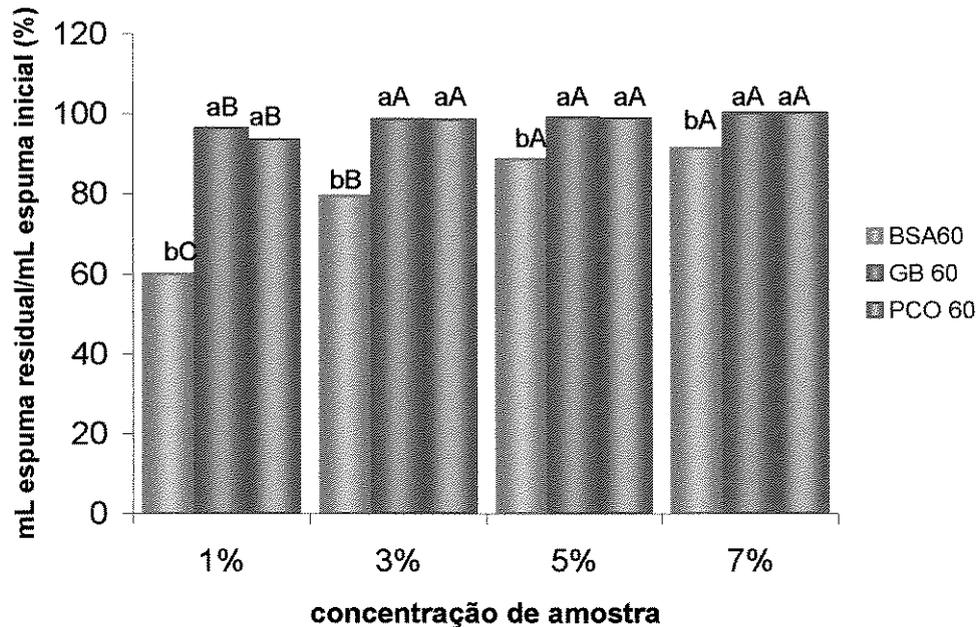


Figura 16. Estabilidade da espuma formada pela BSA, GB e PCO após 60 minutos, variando-se a concentração de proteína. Letras minúsculas comparam amostras diferentes com mesma concentração e letras maiúsculas, entre a mesma amostra com concentrações diferentes. Diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

Todas as espumas com 1% de concentração apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na estabilidade após 60 minutos em relação às demais concentrações. É importante ressaltar que em todos os ensaios de propriedades espumantes as concentrações foram expressas em quantidade de amostra, e não de proteína.

PENTEADO *et al.* (1979) fizeram a estabilidade da espuma pela diferença de pesos do líquido drenado depois de 5, 10 e 20 minutos e comparado com o peso da espuma original. Foi relatado que a espuma da BSA e GB são altamente estáveis pois não houve drenagem nos tempos analisados e que a BSA apesar de estabilidade similar às demais proteínas estudadas, possui melhor capacidade de

formação de espuma, analisada através do volume específico de espuma formada.

Na Figura 17, estão apresentadas as barras de formação de espuma das duas frações do soro sanguíneo em diferentes pHs.

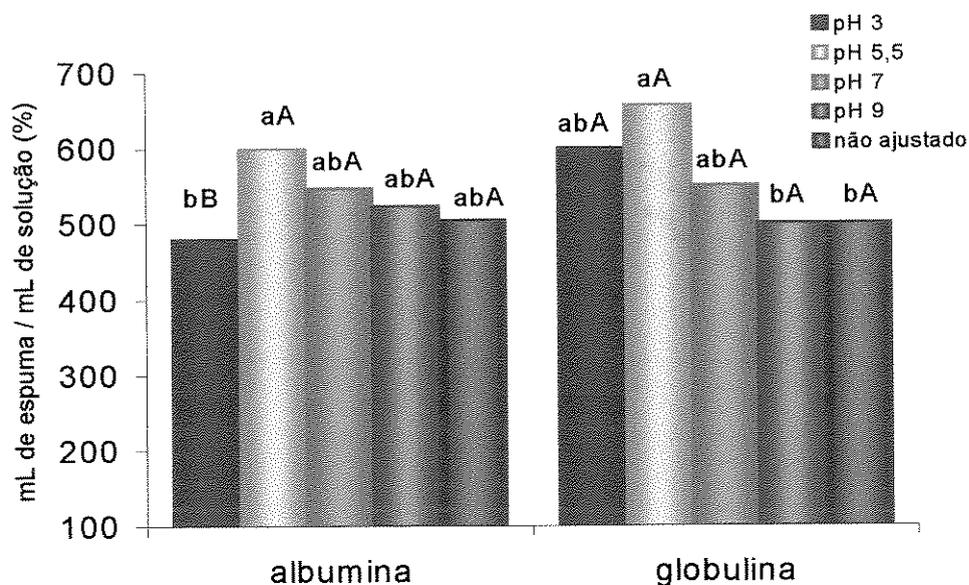


Figura 17. Formação de espuma das frações protéicas do soro sanguíneo com variação do pH. O pH não ajustado é o pH da solução que corresponde a 6,5 e 4,8 respectivamente para BSA e GB. As letras minúsculas comparam os resultados entre a mesma amostra com pHs diferentes e as maiúsculas entre amostras diferentes e mesmo pH. Diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

Para a fração BSA, apenas o pH 3 afetou a formação de espuma negativamente. Já a GB, teve sua capacidade de formação de espuma melhorada nos pHs 3, 5,5 e 7. No pH 9, essa propriedade não foi afetada.

As curvas de cinética de drenagem da espuma (Figura 18) ilustram o processo de desestabilização da espuma. Observe que as espumas de BSA são menos estáveis que as de GB, principalmente a de concentração mais baixa, que chega a drenar 90 mL em 25 minutos. Nos primeiros minutos depois que a espuma foi formada é quando ocorre a maior taxa de desestabilização, e a esses

pontos pode-se ajustar uma reta, e a tangente desta indica quão estável é a espuma.

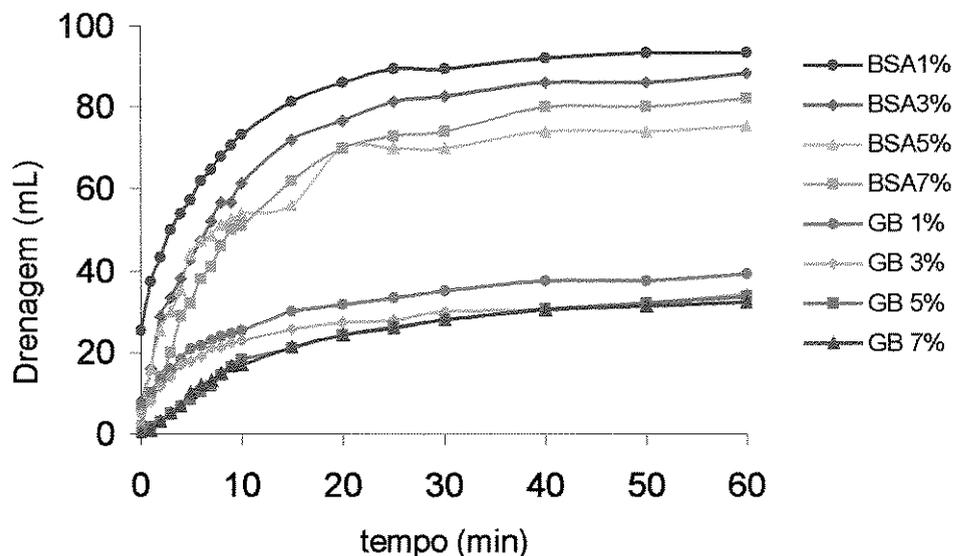


Figura 18. Cinética de drenagem das espumas das frações protéicas.

Pensando nesta aproximação, ELIZALDE *et al.* (1991) propôs um modelo matemático, para calcular os valores da cinética de drenagem (Tabela 10). Três critérios quantitativos são utilizados para comparar as propriedades estabilizantes das proteínas: o tempo necessário para drenar metade da quantidade máxima de líquido (B), que independe do volume inicial de líquido, a constante de velocidade de drenagem de primeira ordem (k) e a taxa inicial de drenagem (R_0).

Quanto maior o valor de R_0 menos estável é a espuma formada e, se a espuma apresentar altos valores de B e baixos de k , indica alta estabilidade. Observando as amostras BSA e GB a partir de 1% de concentração, é nítido que a taxa de drenagem foi reduzida com o aumento da concentração. Isto indica um aumento na estabilidade da espuma, devido a quantidade de proteína presente.

Tabela 10. Drenagem de líquido das espumas protéicas com variação da concentração de amostra.

amostra	V (mL)	B (min)	Ro (mL/min)	K (mL/min)
GB 1%	39,17	3	13,06	0,0085
GB3%	34,33	3	11,44	0,0097
GB5%	33,67	9	3,74	0,0033
GB7%	32,33	8	4,04	0,0039
BSA 1%	46,67	1	46,67	0,0214
BSA 3%	44,17	5	8,83	0,0045
BSA 5%	37,67	4	9,42	0,0066
BSA 7%	40,67	6	6,78	0,0041

V (mL) volume máximo de soro drenado; B (min) tempo meia vida da espuma; Ro (mL/min) taxa de drenagem inicial; K (mL/min) constante de drenagem

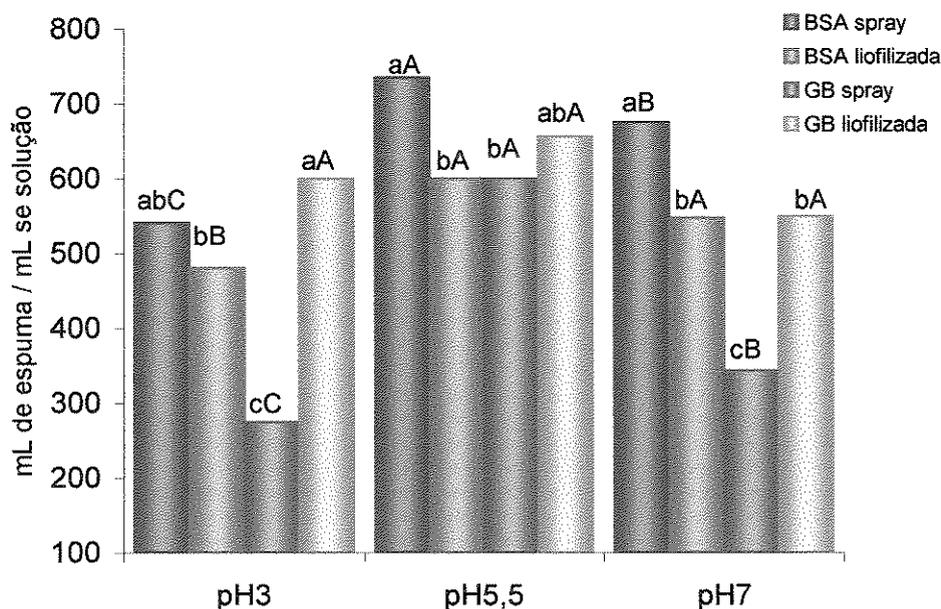


Figura 19 Capacidade de formação de espuma com 1% de proteína liofilizada e desidratada em spray dryer. Letras maiúsculas comparam mesma amostra de pHs diferentes e minúsculas entre mesmo pH. Diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

A Figura 19 ilustra a capacidade de formação de espuma da BSA e GB desidratadas por *spray dryer* em comparação com as liofilizadas. Em todos os pHs, a GB desidratada em spray teve menor formação de espuma em relação à amostra liofilizada. A BSA seca em spray, no entanto, formou mais espuma que a liofilizada. Isto pode ser explicado através da solubilidade. A secagem em spray melhorou a solubilidade da BSA em praticamente todos os pHs, porém a GB só teve sua solubilidade melhorada em pH5,5, mesmo pH onde obteve melhor formação de espuma

A estabilidade da espuma após trinta e sessenta minutos, tempo suficiente para indicar estabilidade da espuma num alimento, em diferentes pHs estão apresentados na Figura 20, para as amostras de BSA seca em spray e liofilizada. As espumas produzidas pelas duas amostras de BSA não tiveram suas estabilidades após trinta minutos alteradas. Porém, após sessenta minutos a espuma da amostra desidratada em *spray dryer*, apresentou-se mais estável em pH 7 que a amostra liofilizada.

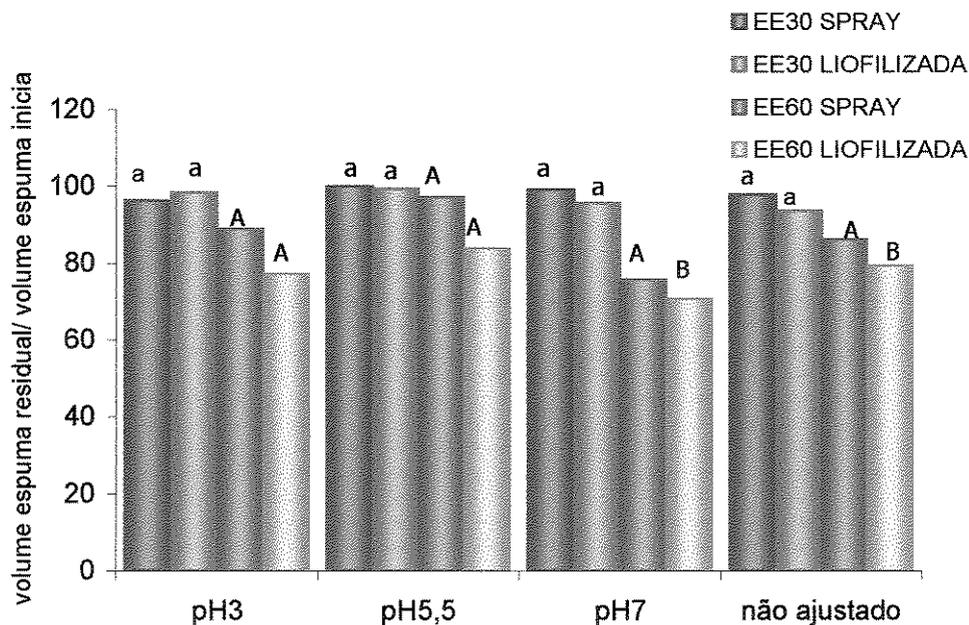


Figura 20. Estabilidade das espumas da BSA em diferentes tempos e pHs. O pH não ajustado corresponde ao pH da solução inicial, sem o ajuste de pH. As letras maiúsculas e minúsculas são comparáveis entre si. Diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

5.3.2 Propriedades de emulsificação

A Figura 21 e a Figura 22 apresentam, em função do pH, as curvas de capacidade de emulsificação (CE) das proteínas BSA e GB, variando-se a força iônica e o pH. A CE da BSA é maior na ausência de sal, em pH ácido (pH 3). Isto pode ser explicado pelo fato das cargas na superfície das moléculas serem positivas. A BSA neste pH é uma molécula parcialmente aberta que mantém a neutralidade elétrica por formar pares de íons com as cadeias protonadas (PETERS, 1985). Nesta região a BSA incha e torna-se aberta como resultado da repulsão de cargas e essa mudança na conformação pode melhorar a CE em pH ácido.

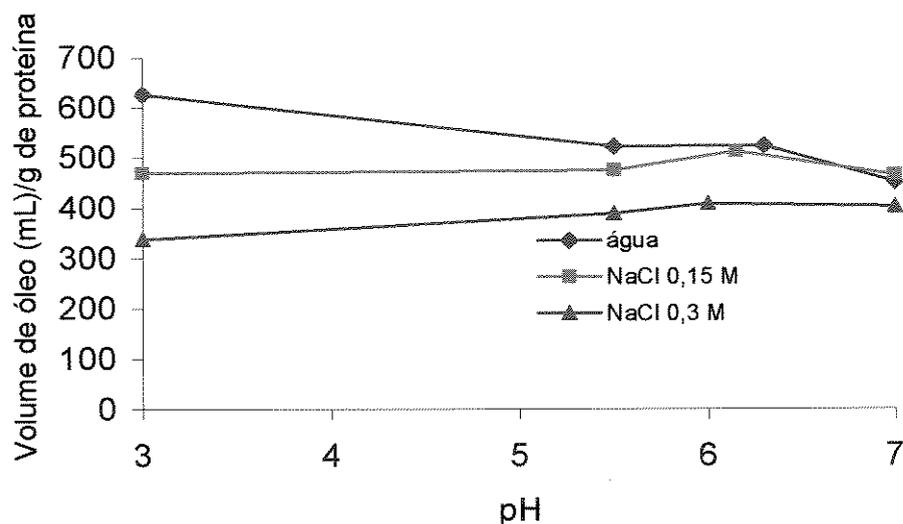


Figura 21. Capacidade emulsificante da BSA de soro sanguíneo (BSA) em função do pH e da concentração de NaCl.

O sal, em 0,15 M de concentração, provoca uma redução na CE da BSA nos pHs 3 a 6, desaparecendo essa diferença nos pHs 6 e 7 e o aumento desta concentração para 0,30M, acentua a redução da capacidade emulsificante nos pHs estudados.

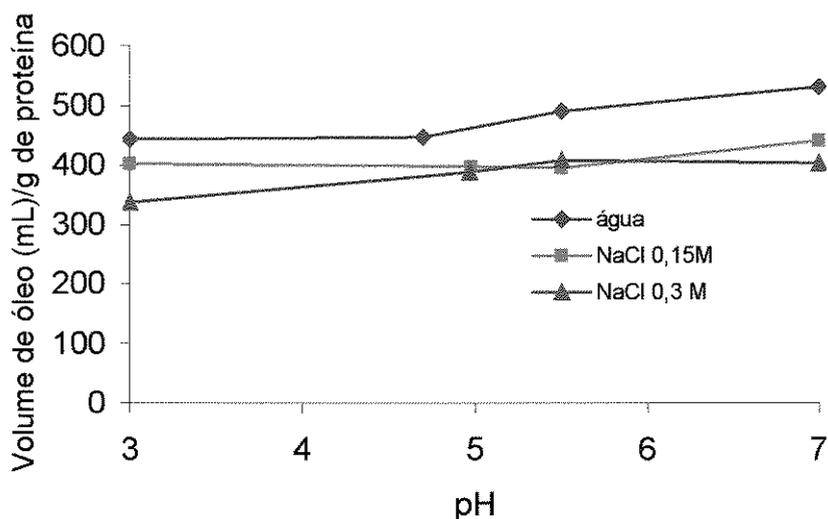


Figura 22. Capacidade emulsificante da GB de soro sanguíneo em função do pH e da concentração de NaCl.

Apesar da GB ter uma capacidade de emulsificação menor que a BSA e do sal ter um efeito menos expressivo sobre esta propriedade, nas duas frações, BSA e GB, o aumento da força iônica provoca uma diminuição na capacidade emulsificante. TORNBERG & EDIRIWEERA (1988) atribui este fato à diminuição da repulsão eletrostática, o que promoveria a agregação (floculação) das proteínas em solução.

A Figura 23 apresenta três curvas de capacidade de formação de emulsão nas mesmas condições (1% de proteína em água) para as duas frações, BSA e GB, comparadas ao concentrado protéico de soro de leite liofilizado (CSD), obtido pelo processamento do leite em queijo, e que demonstra boas propriedades emulsificantes.

O concentrado de soro doce foi utilizado no lugar da clara de ovo pois apesar desta proteína ser um ingrediente chave em muitas emulsões, como a maionese e molhos, ela possui microorganismos patogênicos, tais como a

salmonela. Portanto do ponto de vista tecnológico, não haveria vantagens em se comparar a PCO com nosso produto, já que se tornaria necessário um tratamento térmico para garantir a segurança do produto e este provocaria danos às suas propriedades funcionais, além de emulsões com ovo terem vida de prateleira limitada e precisarem ser mantidas a 4 °C (LE DENMAT, *et al.*, 1999).

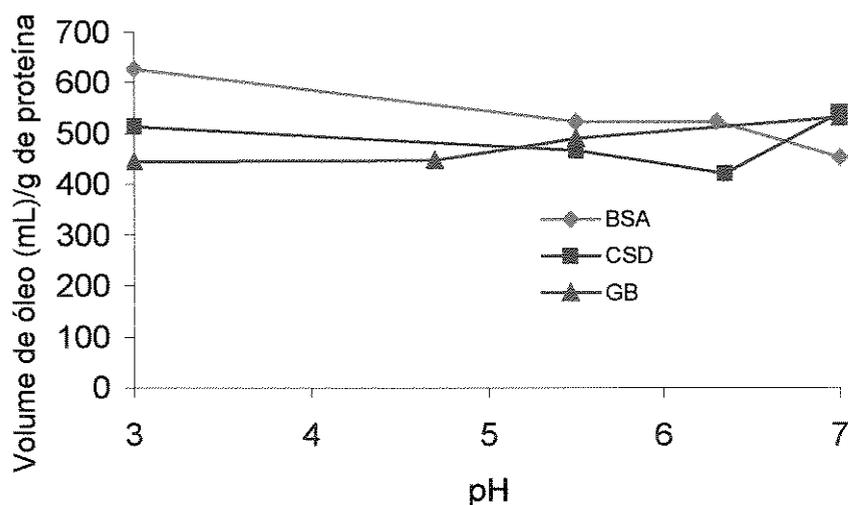


Figura 23. Capacidade de formação de emulsão das frações de proteínas do sangue em comparação com o concentrado protéico de soro doce, dissolvidos em água, em função do pH.

A capacidade emulsionante da BSA é superior às demais e diminui com o aumento do pH. Esta diminuição também ocorre com o CSD, mas o pH neutro (pH 7) provoca uma melhora nesta propriedade. O pH exerceu um efeito contrário sobre a GB, que apresentou menor capacidade emulsificante em pH ácido e o aumento do pH melhorou sua capacidade emulsificante.

No processo de formação de espuma e emulsão, o fator limitante não é a fase dispersante, mas o tipo de proteína com que se trabalha. Isto foi mostrado num estudo feito por GRAHAM & PHILLIPS (1979 I e II) que encontraram que as proteínas adsorveram de maneira semelhante em fases água/ar e água/óleo, porém proteínas de configuração aleatória como a β -caseína apresentaram

isotermas mais condensadas na fase óleo/água e que as globulares como a BSA e a lisozima apresentavam-se mais expandidas quando comparadas com a interface ar/água.

Apesar disso outros fatores influenciam a capacidade de formação de emulsão. WANISKA et al. (1981) analisaram os efeitos de uma variedade de homogeneizadores na atividade emulsionante da proteína de soja, α -caseína, ovoalbumina e β -lactoglobulina e soroalbumina bovina (BSA). Adotou como melhor o Janke-Kunkel (modelo A10) de cinco avaliados, por produzir emulsões com maiores densidades ópticas e menor distribuição de tamanho de partículas.

AL MALAH et al. (2000) investigaram além da formação, a estabilidade de emulsões de BSA pela técnica de condutividade. Foram analisadas a influência do volume de óleo e a concentração de BSA em quatro tipos de óleo vegetais (milho, soja, girassol e oliva). Verificou-se que o óleo de milho não emulsificou baixas concentrações de proteína e que o maior volume incorporado pela proteína foi obtido com o óleo de oliva. O óleo de soja e girassol apresentaram bons resultados de emulsificação da BSA. Portanto, o tipo de óleo utilizado para se fazer a emulsão, também interfere na capacidade emulsificante da proteína. Além disso, FENNEMA (1985) verificou que quanto maior o volume de óleo incorporado maior a estabilidade da emulsão devido o aumento da viscosidade. A estabilidade para 0,5 mg/mL de BSA em óleo de soja foi melhor comparativamente a óleos como oliva, girassol e milho (AL MALAH et al., 2000).

Na Tabela 11 são apresentados os valores da capacidade de emulsificação (C.E.) e das medidas de estabilidade feita pelo método de ACTON & SAFLE (1970). As dispersões de amostra a 1% em pH 3 foram utilizadas, pois neste pH as proteínas apresentaram maior capacidade emulsificante. Os valores indicam uma sensível diferença entre a BSA, o concentrado de soro de leite e a GB, sendo a BSA a que possui melhor propriedade de emulsificação.

Tabela 11. Propriedades emulsificantes da BSA, GB e concentrado de soro doce.

Amostras	CE (mL óleo/g proteína)*	% EE
BSA	626.0 \pm 24,73 ^a	71,04 ^b
GB	443.5 \pm 20,08 ^c	89,50 ^a
CSD	513.9 \pm 17,35 ^b	61,51 ^c

*Capacidade de emulsificação feita em soluções a 1% e pH 3. Valores expressos como média de três determinações \pm desvio padrão. As letras ao lado dos valores dão a ordem de significância estatística com $p < 0,05$.

A estabilidade da emulsão (%EE) foi feita em solução contendo 1% de proteína. A GB apresentou melhor estabilidade, cerca de 90%, seguida da BSA com 71% e, por último o CSD, com, aproximadamente 60%. Este valor indica que após 24 horas, a emulsão desestabilizou-se e a alíquota tomada para se determinar a umidade possuía mais água que gordura em relação à amostra original.

As proteínas que agem pelo mecanismo de formação de filmes coesivos ao redor das gotas de óleo são melhores emulsificantes em termos de estabilidade para emulsões do que surfactantes que funcionam primariamente por reduzir a tensão superficial, isto porque elas promovem uma barreira estérica sem uma significativa diminuição da tensão superficial (FRIBERG, 1997).

A GB apesar de não possuir boa capacidade emulsificante em relação às demais proteínas estudadas foi a amostra de melhor estabilidade. Este fato foi confirmado visualmente e na execução do método. PHILLIPS et al. (1987) mostrou que as proteínas com estrutura nativa altamente ordenada, como é o caso das proteínas globulares, formam filmes interfaciais fortemente coesivos e portanto são eficientes na estabilização de emulsões.

Quando uma solução aquosa que contém proteína é exposta à outra fase, seja ela líquida, sólida ou gasosa ocorre a adsorção da proteína na interface das duas fases. O processo de adsorção envolve vários estágios: o transporte da

proteína através da solução até a região interfacial, a ligação desta proteína com o solvente e a abertura (relaxamento) da molécula, isto é otimização da interação proteína-superfície. Dependendo da extensão da abertura, a molécula pode soltar-se mais ou menos e diminuir esta interação (NORDE & GIACOMELLI, 2000). Isto pode explicar a baixa estabilidade da emulsão de BSA em relação à de GB. Por possuir uma estrutura compacta e com muitas pontes dissulfeto, para formar a emulsão ela se desdobra, mas não permanece com a mesma configuração a fim de conseguir reter totalmente as gotas de gordura que foram emulsionadas.

A Figura 24 mostra a capacidade de emulsificação da BSA desidratada pelos processos de liofilização e *spray dryer* em três diferentes pHs, um ácido, um neutro e um na região isoelétrica (pH 5 a 6).

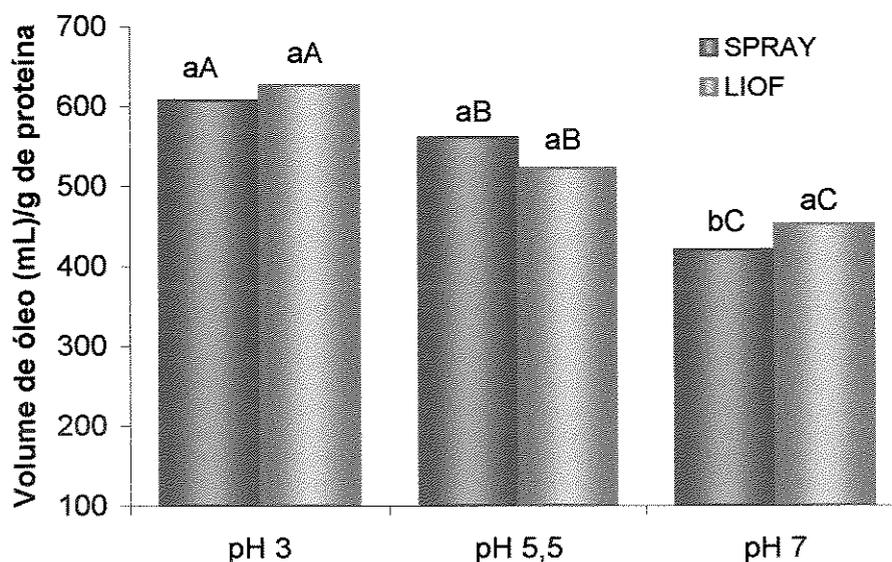


Figura 24. Capacidade de emulsificação da BSA seca por liofilização e por *spray dryer*, em diferentes pHs. Letras minúsculas comparam amostras diferentes entre mesmo pH e letras maiúsculas, entre a mesma amostra com pHs diferentes. Diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

Apenas houve diferença estatística entre as amostras em pH 7, onde a capacidade de formação de emulsão da amostra liofilizada apresentou-se mais

elevada que da amostra desidratada em *spray dryer*. Nos demais pHs, as amostras mostraram-se similares quanto a capacidade de formação de emulsão.

A capacidade de formação de emulsão da GB desidrata por spray e liofilizada é mostrada na Figura 25. Apresentou o mesmo comportamento que a BSA exceto em pH 7, onde a CE da amostra desidratada em spray apresentou-se melhor que a amostra liofilizada. A incorporação de sal na solução a ser feita a emulsão diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a formação de emulsão da GB em pH 5,5 e 7.

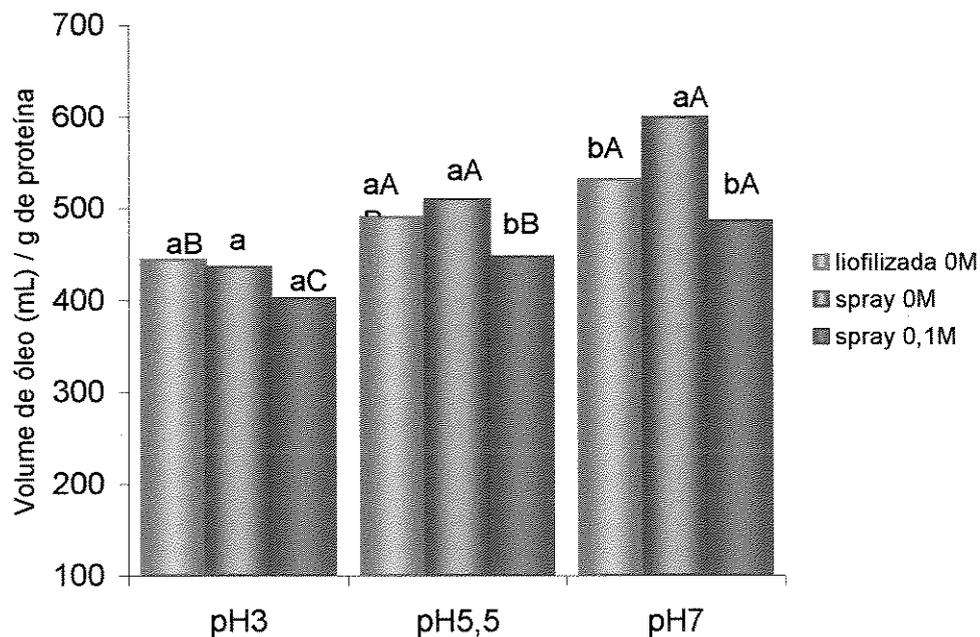


Figura 25. Capacidade de formação de emulsão da GB seca em spray e liofilizada em função do pH e com ajuste da solução salina em 0,1M. As letras minúsculas comparam resposta de amostras diferentes entre mesmo pH e as maiúsculas, entre mesma amostra e pHs diferentes. Diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

5.3.3 Estudo comparativo da estabilidade da emulsão

Foi feita uma comparação dos métodos de estabilidade de emulsão propostos por DAGORN-SCAVINER *et al.* (1987), ACTON & SAFLE (1970) e PEARCE & KINSELLA (1978). Tais métodos foram comparados pela dificuldade

de se estabelecer uma metodologia padronizada de trabalho, além do que, o método utilizado por PEARCE & KINSELLA (1978) parece não corresponder com a prática, já que ele faz uso de tampões e detergente.

Pelo primeiro método citado, não foi possível chegar a um resultado imediato, pois houve muita dificuldade de visualização da separação das fases. Mesmo com a adição de um corante para facilitar esse processo, a proveta utilizada (10 mL) prejudicou a leitura dos primeiros minutos de desestabilização da emulsão, podendo o processo apenas ser observado ao final do tempo proposto. O método se propõe a medir o cremeamento e a floculação da emulsão e diante de tais dificuldades, desistiu-se do intento de compará-lo com as demais metodologias. Os resultados da estabilidade da emulsão por ACTON & SAFLE (1970) (Estabilidade da emulsão (%)) e PEARCE & KINSELLA (1978) (Índice de estabilidade da emulsão IEE(h)) estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Estabilidade das emulsões das proteínas liofilizadas.

Amostra protéica	EE(%)*	IEE(h)*
Albumina de soro bovino (BSA)	60,42±1,72 ^b	3,67±0,36 ^b
Globulina de soro bovino (GB)	90,94 ±3,67 ^a	5,26±0,50 ^a
Concentrado de soro doce (CSD)	62,47±2,04 ^b	3,99±0,25 ^b

*Valores expressos como média de três determinações ± desvio padrão. As letras diferentes (colunas) indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Os valores obtidos em cada método representam parâmetros diferentes. No primeiro EE% (estabilidade da emulsão), a estabilidade é calculada com base na diferença de umidade tomada do fundo da proveta com 0 e 24 horas após emulsificação. O índice IEE (h) da Tabela 12 diz respeito à diferença de opacidade da amostra, observada pela leitura em espectrofotômetro, assim que foi feita e depois de um período de tempo.

Apesar das diferenças de métodos, os dois indicaram que a GB é a proteína que forma a emulsão mais estável e que o CSD e a BSA produzem emulsões com estabilidades semelhantes.

5.4 Conclusões

As proteínas do sangue mostraram formação de espuma similar à da proteína da clara de ovo sendo melhor em baixa concentração (1%). O pH, melhorou a capacidade de formação de espuma da fração GB, e apenas o pH 3 afetou a formação de espuma da BSA, negativamente. As amostras BSA e GB (1%) tiveram a taxa de drenagem reduzida com o aumento da concentração, indicando aumento da estabilidade da espuma, devido a presença da proteína. A BSA forma espuma menos estável que a GB, principalmente em baixa concentração.

GB desidratada em spray apresentou menor formação de espuma em relação à amostra liofilizada e o contrário aconteceu com a BSA. As diferenças de comportamento entre as amostras liofilizadas e desidratadas em spray, podem ser explicadas através da solubilidade. A secagem em spray melhorou a solubilidade da BSA em praticamente todos os pHs, porém a GB só teve sua solubilidade melhorada em pH5,5, mesmo pH onde obteve melhor formação de espuma.

A GB apesar de não possuir boa capacidade emulsificante em relação às demais proteínas estudadas foi a amostra que apresentou melhor estabilidade. A estabilidade da emulsão de BSA em relação à de GB é menor provavelmente devido sua estrutura que não permite a permanência na configuração apropriada para reter totalmente as gotas de gordura que foram emulsionadas.

5.5 Referências bibliográficas

- ACTON, J.C.; SAFLE, R.L.. *Stability of oil-water emulsion 1. Effects of surface tension, level of oil, viscosity and type of meat protein.* **Journal of Food Science**, Chicago, v.35, n.9, p.852-855, 1970.
- AL-MALAH, K.I.; AZZAM, M.O.J., OMARI, R.M. *Emulsifying properties of BSA in different vegetable oil emulsions using conductivity technique.* **Food Hydrocolloids**, Londres, v.14, p.485-490, 2000.
- AOAC-Association Of Official Analytical Chemists, **Official methods of analysis** 15.ed. Washington, 1990. v. 1-2.
- CLARKSON, J.R.; CUI, Z.F.; DARTON, R.C. *Effect of solution conditions on protein damage in foam,* **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.4, n.1, p. 104-114, 2000.
- DAGORN-SCAVINER, C.; GUEGUEN, J.; LEFEBVRE, J. *Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors.* **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.2, p.335-341, 1987.
- DE KANTEREWICZ, R.J.; ELIZALDE, B.E.; PILOSOF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. *Water-oil absorption index (WOAI): a simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins.* **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.5, p.1381-1383, 1987.
- DOI, E; KITABATAKE, N; HATTA, H; KOSEKI, T. *Relationship of SH groups to functionality of ovalbumin.* In Kinsella, J.E; Soucie, G.W. **Food Proteins**. Champain: Ed. American Oil Chemists' Society ,1988. Cap. 15, p.252-265.
- ELIZALDE, B.E.; GIACCAGLIA, D.; PILOSOF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. *Kinetics of liquid drainage from protein-stabilized foams.* **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, n.1, p.24-26, 1991.

- FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1985. 991p.
- FRIBERG, S.E. *Emulsion Stability*. In **Food Emulsions**, editado por FRIBERG, S.E.; LARSSON, K; 3^ªed; Nova York, 582p; 1997.
- GRAHAM, D.E.; PHILLIPS, M.C. *Proteins at liquid interfaces. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation*. **Journal of Colloid Interface Science**, San Diego, v.70,n.2, p. 403-414, 1979.
- GRAHAM, D.E.; PHILLIPS, M.C. *Proteins at liquid interfaces. II. Adsorption isotherms*. **Journal of Colloid Interface Science**, San Diego, v.70, n.2, p. 415-426, 1979.
- LE DENMAT, M.; ANTON, M.; GANDEMER, G. *Protein denaturation and Emulsifying properties of plasma and granules of egg yolk as related to treatment*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, n.2, p. 194-197, 1999.
- MOHANTY, B.; MULVIHILL, D.M.; FOX, P.F. *Emulsifying properties of acidic caseins and sodium caseinate*. **Food Chemistry**, Barking, v.28, n.1, p.17-30, 1988.
- NORDE, W.; GIACOMELLI, C.E. *BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, n.79, n.1, p. 259-268, 2000.
- PATEL, P.D.; STRIPP, A.M.; FRY, J.C. *Whipping test for the determination of foaming capacity of protein: a collaborative study*. **International Journal of Food Science and Technology**, New York, v.23, n.1, p.57-63, 1988.
- PEARCE, K.N.; KINSELLA, J.E. *Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique*. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.26, p.716 - 723, 1978.

PENTEADO, M.V.C.; LAJOLO, M.F.; SANTOS, N.P. *Functional and Nutritional Properties of Isolated Bovine Blood Proteins. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, v.30, p.809-815, 1979.*

PETERS, T.Jr. *Serum albumin. In: Advances in Protein Chemistry. Orlando: Academic Press, 1985. Vol.37, p.165-245.*

PHILLIPS, L.G; HAQUE, Z; KINSELLA, J.E. *A method for the measurement of foam formation and stability. Journal of Food Science, Chicago, v.52, n.4, p.1077, 1987.*

TORNBERG, E.; EDIRIWEERA, N. *Factors that influence the coalescence stability of protein-stabilised emulsions, estimated from the proportion of oil extracted by hexane. Journal of the Science Food and Agriculture, London, v.46, n.1, p.93-113, 1988.*

WANISKA, R.D.; SHETTY, J.K.; KINSELLA, J.E. *Protein-stabilized emulsions: Effects of modification on the emulsifying activity of bovine serum albumin in a model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v.29,n.4, p.826-831, 1981.*

Capítulo 6. Análise comparativa da solubilidade e capacidade emulsificante entre BSA e resíduo da secagem em spray através superfície de resposta.

Resumo

Sabe-se que o método de secagem pode interferir na estrutura de uma proteína por causar desnaturação ou alguma reação química. Durante o processo de secagem em spray dryer a amostra fica por um tempo muito pequeno em contato com alta temperatura, não sofrendo muitas alterações. O resíduo do material seco, no entanto, permanece durante todo o processo dentro da câmara de secagem aderido às paredes do equipamento. As propriedades químicas e físicas deste material certamente diferirão da amostra original. A análise desta diferença física foi realizada através da solubilidade, principal indicador de desnaturação protéica, e da capacidade de emulsificação das duas amostras, BSA e GB.

Fez-se uso de um planejamento experimental e da análise de superfície de resposta, para realizar um ensaio em diversas condições de variáveis. Através deste estudo pôde-se determinar a faixa de operação para obtenção de respostas maximizadas de solubilidade e emulsificação, e verificar as diferenças provocadas nas propriedades da BSA causada pelo tratamento térmico. O planejamento

experimental é uma ferramenta que permite o estudo da interação das variáveis numa propriedade, podendo através de reduzido número de ensaios obter uma tendência de comportamento. Pode ser validado pela análise de variância, pelo grau de confiança utilizado e pelo coeficiente de regressão. Caso os testes de validação não sejam adequados, pode-se detectar erro de planejamento ou erro experimental, dependendo do valor dos resíduos, e isto certamente inviabiliza a aceitação dos dados.

As amostras, como esperado, mostraram diferenças nas características funcionais, sendo mais acentuadas na solubilidade. A solubilidade da amostra e do resíduo apresentou uma diferença de 6,35% e as variáveis influenciaram em intensidades e maneiras opostas. Mesmo assim, a BSA na forma de resíduo, apresentou boa solubilidade e propriedade emulsificante, mas certamente isto se deve à sua estrutura compacta e com muitas pontes dissulfeto.

6.1 Materiais e Métodos

6.1.1 Materiais utilizados

Foram verificadas duas propriedades funcionais (solubilidade e capacidade de formação de emulsão) na BSA desidratada em spray dryer (A/S Niro Atomizer, temperatura de entrada $T_e=250^{\circ}\text{C}$ e temperatura de saída $T_s=80^{\circ}\text{C}$) e seu resíduo que permaneceu na câmara de secagem até o final do processo, aproximadamente 3 horas.

6.1.2 Métodos

Foi delineado estatisticamente um experimento fatorial completo para examinar o efeito da interação da temperatura de solubilização ($^{\circ}\text{C}$), da concentração de NaCl (M) e do pH na solubilidade e as duas últimas variáveis na capacidade de formação de emulsão da BSA e de seu resíduo, e analisado em

Statistic for Windows, versão 5,0, Starsoft. Cada variável foi analisada em três níveis (-1, 0 e 1) e em dois axiais (+a, -a) compondo um total de 16 e 11 ensaios respectivamente para a solubilidade e a capacidade de emulsificação.

Nas Tabelas 13 e 14 estão apresentados valores reais e os níveis dos fatores estudados no ensaio de solubilidade e capacidade de emulsificação, respectivamente.

Tabela 13. Planejamento fatorial completo (2^3) para solubilidade com três variáveis e cinco níveis.

Variáveis	Níveis				
	-08	-1	0	1	+08
pH	2,58	3	5	7	7,42
NaCl (M)	0	0,05	0,1	0,15	0,16
T(°C)	22,9	25	35	45	47,10

A solubilidade foi determinada com base no método de MORR et al. (1985), com a modificação das condições de pH, concentração de sal e temperatura da solução ditada pelo planejamento experimental. e a capacidade de emulsificação foi determinada pelo método de DE KANTEREWICZ et al. (1987).

Tabela 14. Planejamento fatorial completo (2^2) para a capacidade de formação de emulsão com duas variáveis e cinco níveis.

Variáveis	Níveis				
	-08	-1	0	1	+08
pH	2,54	3,5	5	6,5	7,46
NaCl (M)	0	0,05	0,10	0,15	0,20

6.2 Resultados e Discussões

6.2.1 Interação dos parâmetros na solubilidade

Na Figura 26 estão apresentados os valores dos ensaios de solubilidade para as amostras de BSA desidratada em spray e seu resíduo realizados nas combinações ditadas pelo planejamento experimental. De uma maneira geral, a solubilidade da BSA foi maior que a de seu resíduo.

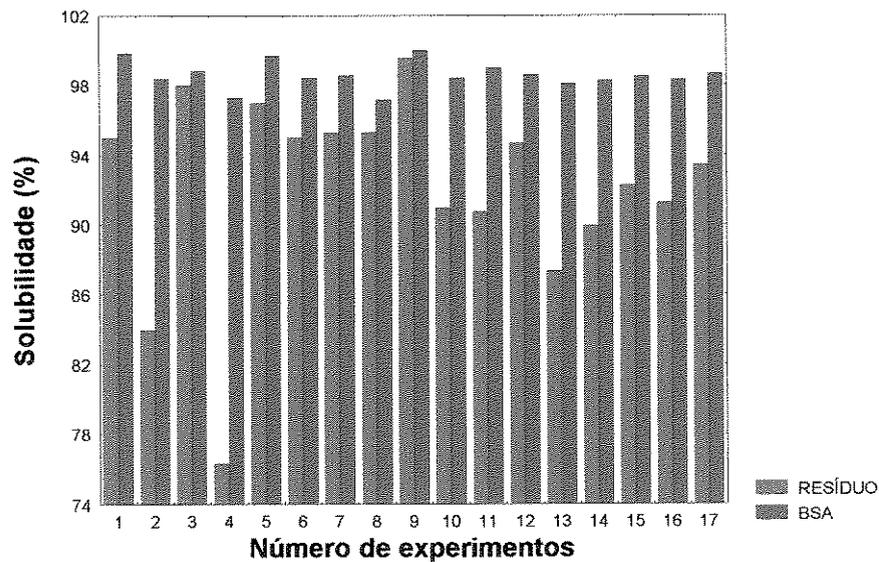


Figura 26. Valores experimentais obtidos para a solubilidade do resíduo e da BSA seca em spray.

A Tabela 15 e a Tabela 16 mostram os efeitos estatisticamente significativos das variáveis e suas interações sobre a solubilidade das amostras estudadas. A primeira coluna representa qual a grandeza da influência da variável sobre a propriedade estudada. Na Tabela 15, todos os efeitos principais foram negativos, o que corresponde a dizer que ao aumentar o pH, a concentração de NaCl ou a temperatura, reduziu-se a solubilidade e a variável que mais exerce influência na solubilidade da BSA seca em spray é o pH, reduzindo-a em 1,4 %, ao se alcalinizar o meio. Essa mesma variável foi a que exerceu maior influência sobre a solubilidade do resíduo (Tabela 16), porém a variável é responsável por

uma diminuição de 8,24% na solubilidade do resíduo contra 1,4% da BSA. Através de uma regressão multilinear dos ensaios, determinou-se o modelo matemático correspondente à curva de superfície de resposta da solubilidade, e que de acordo com os métodos de validação (em anexo) representam bem a curva gerada pelo planejamento.

Tabela 15. Efeitos significativos das variáveis sobre a solubilidade da BSA.

	Coefficiente de regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	98,61	0,08	1292,09	0,0000
pH (L)	-0,69	0,10	-14,45	0,0048
pH (Q)	0,32	0,14	4,47	0,0466
NaCl (L)	-0,46	0,10	-9,55	0,0108
NaCl (Q)	0,04	0,14	0,51	0,6597
T (L)	-0,02	0,10	-0,46	0,6916
T (Q)	-0,40	0,14	-5,54	0,0310
pH x NaCl	-0,02	0,11	-0,35	0,7622
pH x T	0,04	0,11	0,74	0,5360
NaCl x T	-0,04	0,11	-0,71	0,5494

*em vermelho: $p < 0,05$ (estatisticamente significativo a 95% de confiança). Solubilidade BSA = $98,61 - 0,69 \cdot \text{pH} + 0,32 \cdot \text{pH}^2 - 0,46 \cdot \text{NaCl} - 0,40 \cdot T^2$

Tabela 16. Efeitos significativos das variáveis sobre a solubilidade do resíduo da BSA.

	Coefficiente de regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	92,35	0,51	179,59	0,0000
pH (L)	-4,12	0,65	-12,72	0,0061
pH (Q)	1,97	0,96	4,09	0,0549
NaCl (L)	-0,12	0,65	-0,38	0,7403
NaCl (Q)	0,23	0,96	0,48	0,6765
T (L)	2,97	0,65	9,17	0,0117
T (Q)	-2,55	0,96	-5,31	0,0337
pH x NaCl	-1,08	0,76	-2,86	0,1035
pH x T	3,84	0,76	10,14	0,0096
NaCl x T	0,41	0,76	1,08	0,3919

* Em vermelho: $p < 0,05$ (estatisticamente significativo a 95% de confiança). Solubilidade resíduo = $92,35 - 4,12 \cdot \text{pH} + 2,97 \cdot T - 2,55 \cdot T^2 - 3,84 \cdot \text{pH} \cdot T$

A temperatura, no caso da BSA, não alterou a solubilidade de forma significativa ($p>0,05$). O mesmo ocorreu em relação ao resíduo, que apesar de estar no limite estatístico revelando um possível dano à estrutura da amostra, apresentou alta solubilidade (93%). Portanto, mesmo após todo o tempo de exposição (3 horas) sob condições de alta temperatura, a BSA não teve sua estrutura muito alterada, indicando alta estabilidade frente à condição desnaturante de temperatura.

As Figuras 27 a 32, delineiam as curvas de solubilidade. A superfície de resposta representa graficamente a tendência da solubilidade sob influência das variáveis utilizadas e por isso a escala mostrando o valor acima de 100% é apenas uma tendência estatística e não tem significado físico. As curvas de contorno mostradas abaixo da superfície de resposta correspondente, facilitam a visualização da interação dos parâmetros sobre as propriedades estudadas.

A Figura 27 e a Figura 28 representam as interações dos mesmos parâmetros, pH e concentração salina, na solubilidade da BSA desidratada em spray e da BSA residual, respectivamente. Dentro da faixa de valores estudados para tais parâmetros, a solubilidade da BSA não mostrou muita variação, mantendo-se em torno de 98%. O aumento de solubilidade em relação à amostra liofilizada (95%, em média) poderia ser esperado porque o atomizador forma partículas menores e estas são mais fáceis de se dissolverem. As variáveis influenciaram de maneira e intensidade diferentes as duas amostras sendo que o resíduo ficou susceptível a variação de pH e T.

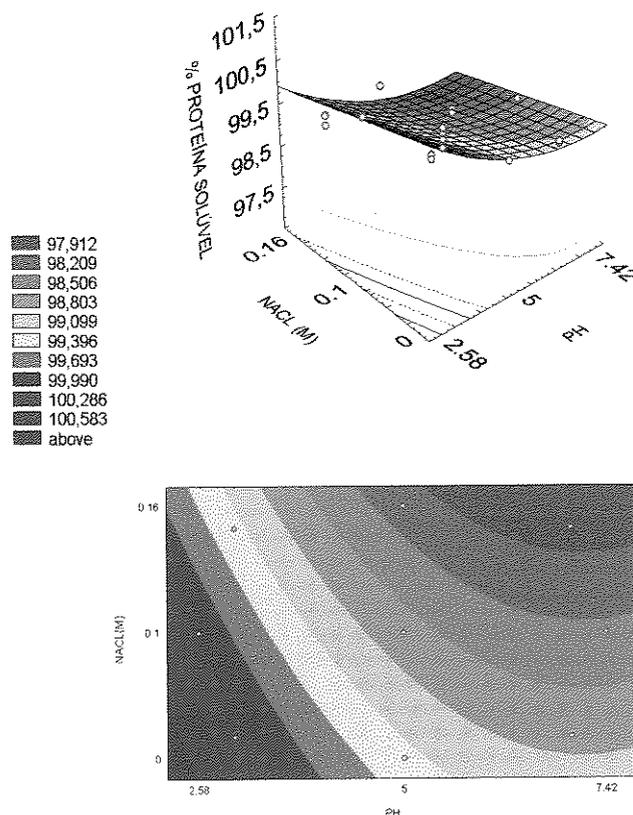


Figura 27. Superfície de resposta e curva de contorno da solubilidade da BSA seca em spray em função da concentração de sal (0 a 0,16M) e do pH (2,58 a 7,42).

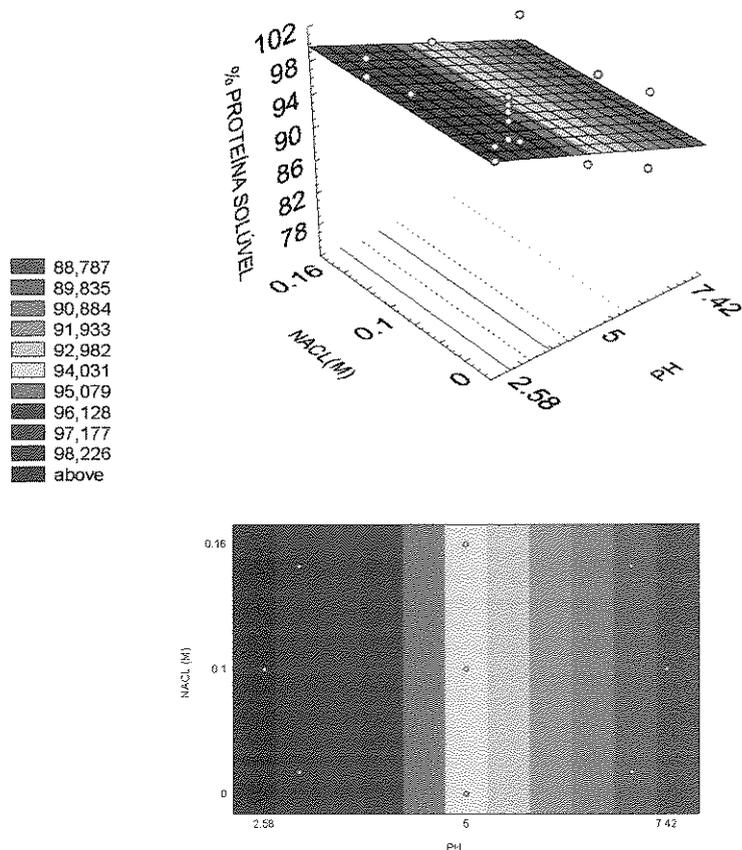


Figura 28. Superfície de resposta e curva de contorno da solubilidade do resíduo da BSA seca em spray em função da concentração de sal (0 a 0,16M) e do pH (2,58 a 7,42).

Apesar do resíduo sofrer maior variação de solubilidade que a BSA seca em spray, como mostra a Figura 28, ele se manteve altamente solúvel em toda a faixa de pH estudada, variando a solubilidade de 89 a 100%. A concentração salina não interferiu significativamente ($p > 0,05$) na solubilidade do resíduo que tende melhorar mantendo-se o pH em região ácida com qualquer concentração de sal.

Nas Figura 29 e Figura 30 estão apresentadas as curvas de solubilidade sob influência da temperatura e do pH para BSA. Existe um ótimo de solubilidade na faixa de 23 a 40°C e em pH extremamente ácido, a solubilidade diminui

independente da temperatura, quando vai se alcalinizando o meio. O resíduo apresentou uma faixa maior de solubilidade ótima, sendo que a solubilidade só passou a reduzir a partir do pH 5.

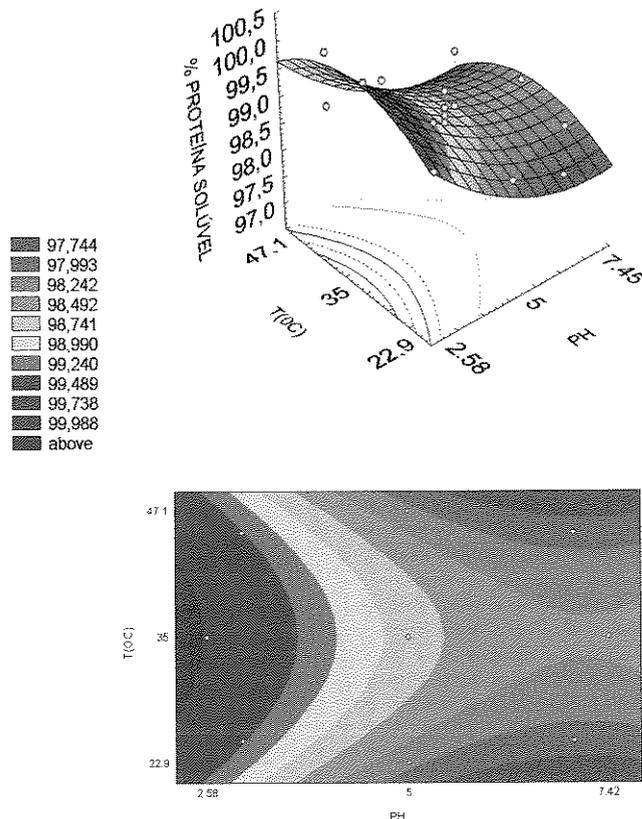


Figura 29. Superfície de resposta e curva de contorno da solubilidade da BSA seca em spray em função da temperatura (23 a 45°C) e do pH (2,58 a 7,42).

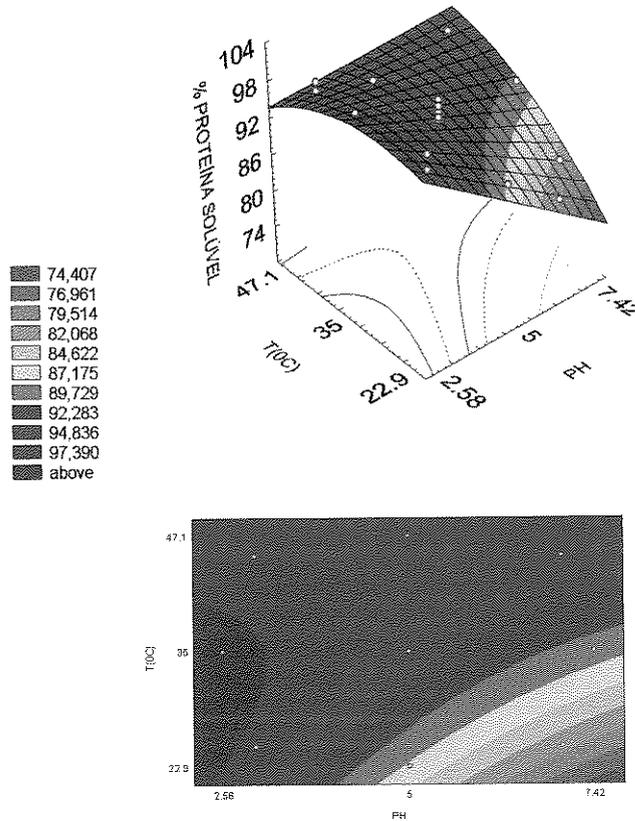


Figura 30. Superfície de resposta e curva de contorno da solubilidade do resíduo da BSA seca em spray em função da temperatura (23 a 45°C) e do pH (2,58 a 7,42).

As Figura 31 e Figura 32, mostram a influência da interação da temperatura e da concentração de cloreto de sódio. Os extremos de temperatura provocaram diminuição de solubilidade, não significativa, diferentemente do resíduo, que apresentou melhora significativa ($p < 0,05$) de solubilidade com o aumento de temperatura. A temperatura mostrou maior influência sobre esta amostra, que a concentração salina. Isto pode ser devido a alguma alteração na estrutura da proteína devido a temperatura do processo de secagem, que a manteve por um tempo prolongado numa alta temperatura.

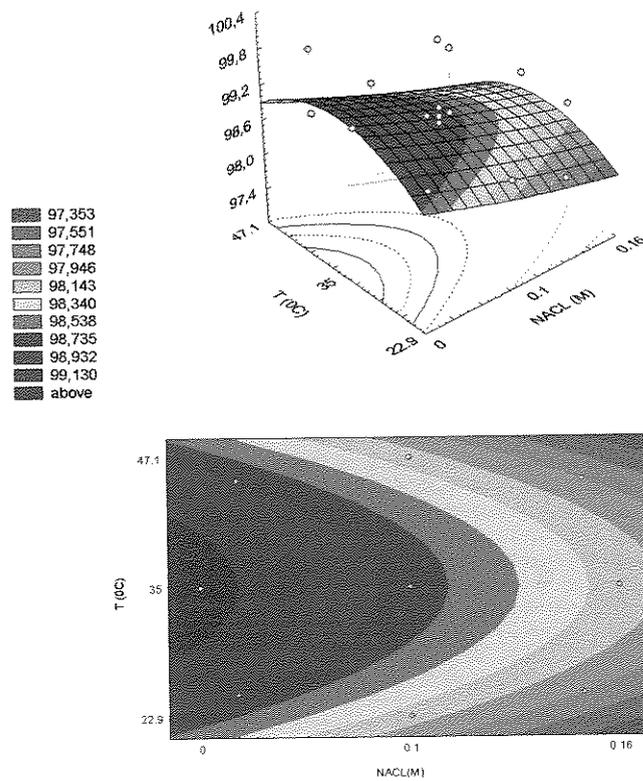


Figura 31. Superfície de resposta e curva de contorno da solubilidade da BSA seca em spray em função da concentração de sal (0 a 0,16M) e da temperatura (23 a 45°C).

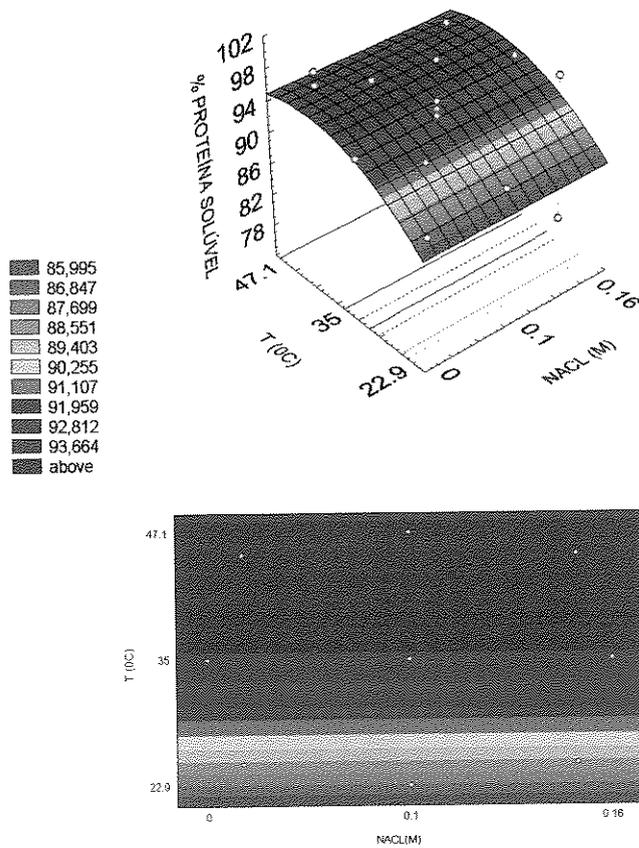


Figura 32. Superfície de resposta e curva de contorno da solubilidade do resíduo da BSA seca em spray em função da concentração de sal (0 a 0,16M) e da temperatura (23 a 45°C).

6.2.2 Interação dos parâmetros na capacidade de formação de emulsão

A Figura 33 apresenta os resultados experimentais obtidos para o ensaio de capacidade de formação de emulsão.

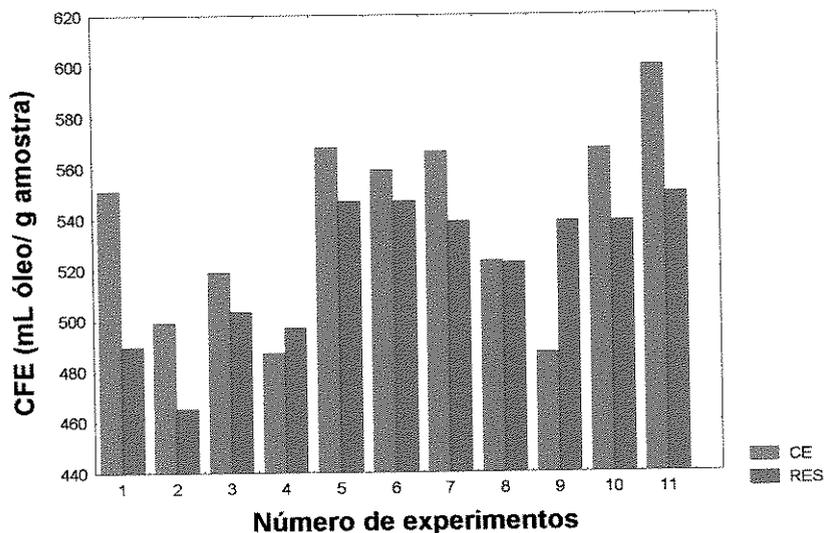


Figura 33. Valores experimentais dos ensaios de capacidade emulsificante da BSA (CE) e seu resíduo (RES).

Como ocorreu com a solubilidade, a BSA apresentou maior capacidade de emulsificação na maioria dos ensaios, e como é sabido, a solubilidade é uma propriedade que interfere na formação de emulsão da amostra. Os efeitos das variáveis e suas interações são mostrados nas Tabela 17 e Tabela 18 .

Tabela 17. Efeitos significativos das variáveis sobre a emulsificação da BSA.

	Efeito	Desvio padrão	t(2)	p*
Média	555,55	1,865	297,882	0,000
pH	-9,55	1,885	-10,135	0,010
pH (Q)	-42,85	4,712	-18,187	0,003
NaCl	-2,91	1,885	-3,089	0,091
NaCl(Q)	35,46	4,712	15,049	0,004
pH x NaCl	0,88	0,826	2,133	0,167

*Em vermelho: $p < 0,05$ (estatisticamente significativo a 95% de confiança)

$$CFE_{BSA} = 555,55 - 9,55 \cdot pH - 42,85 \cdot pH^2 + 35,46 \cdot NaCl^2$$

Os valores de formação de emulsão não diferiram para as duas amostras, em média.

Tabela 18. Efeitos significativos das variáveis sobre a emulsificação do resíduo da BSA.

	Coeficiente	Desvio padrão	t(2)	p*
Média	543,20	1,878	289,256	0,000
pH	-2,33	1,898	-2,457	0,133
pH (Q)	-11,66	4,745	-4,915	0,039
NaCl	4,86	1,898	5,127	0,036
NaCl(Q)	2,09	4,745	0,882	0,471
pH x NaCl	0,79	0,831	1,905	0,197

*Em vermelho: $p < 0,05$ (estatisticamente significativo a 95% de confiança)

$$CFE\ RES = 543,20 - 11,66.pH^2 + 4,86\ NaCl$$

As variáveis afetaram bastante a capacidade emulsificante das amostras, sendo que o aumento do pH provocou uma redução de 18 e 22%, aproximadamente, da BSA e do resíduo.

As superfícies de resposta para o planejamento experimental realizado para o ensaio de capacidade de formação de emulsão estão apresentadas na Figura 34 e Figura 35. Observa-se que as duas curvas possuem a mesma tendência, porém a BSA seca em spray apresenta uma curvatura em relação ao pH e uma variação de valores maiores que o resíduo.

Esta aparência de ceda da BSA seca em spray deve-se sobretudo à influência antagônica de pH e concentração salina. Enquanto o aumento de pH exerce um efeito negativo sobre a CFE da BSA, o aumento da concentração salina provoca a reação inversa. Por isso uma maior curvatura em relação à curva do resíduo, que sofre maior influência do pH que da concentração salina.

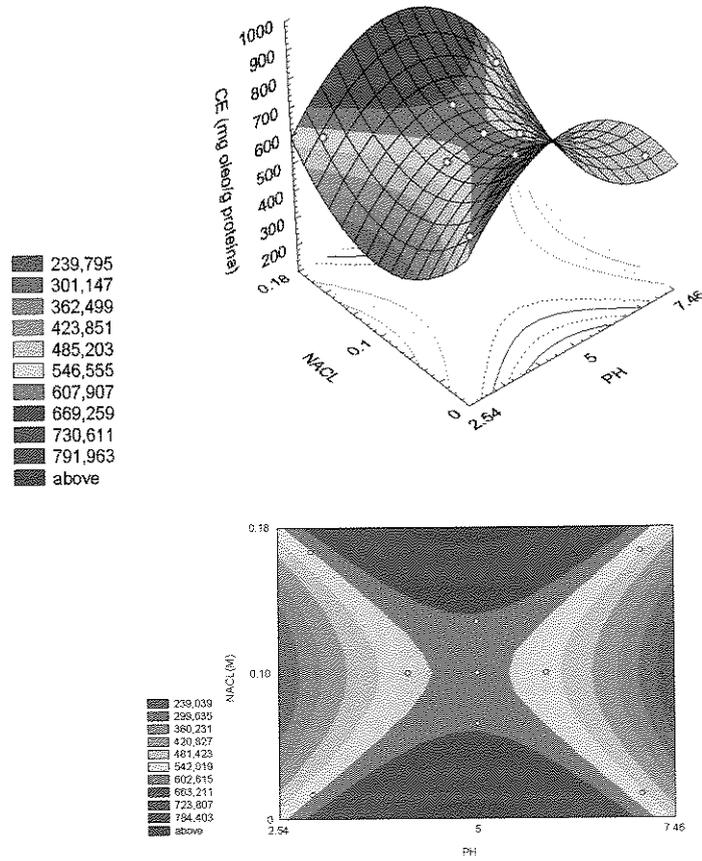


Figura 34. Superfície de resposta e curva de contorno da capacidade de emulsificação da BSA seca em spray.

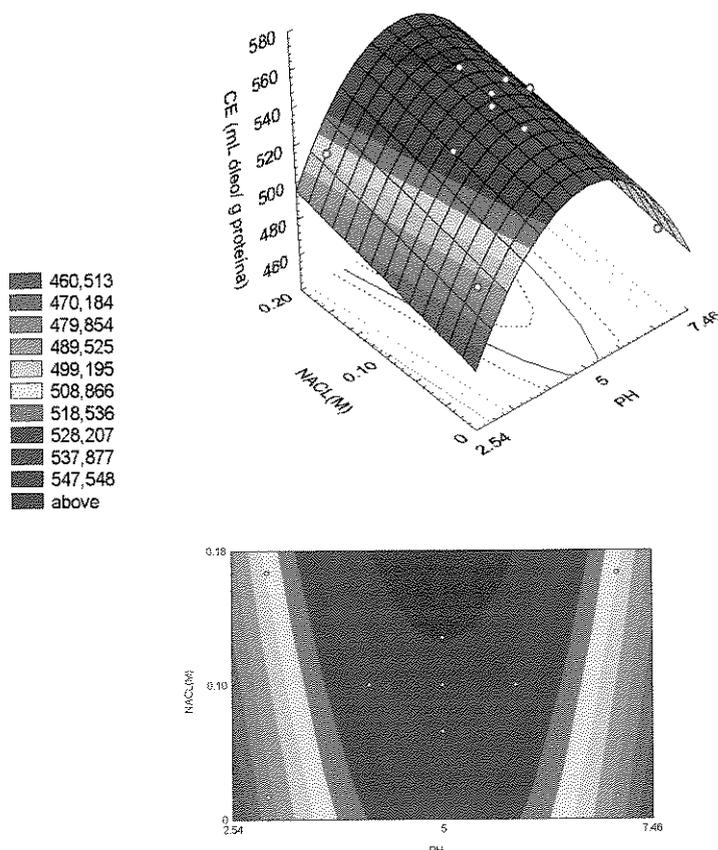


Figura 35. Superfície de resposta e curva de contorno da capacidade de emulsificação do resíduo da BSA seca em spray.

6.3 Conclusões

O planejamento experimental dos ensaios de solubilidade e capacidade de emulsificação foi muito útil para observar a interação das variáveis antes estudadas individualmente. Tanto para a solubilidade quanto para a capacidade de emulsificação, esta interação de variáveis não interferiu significativamente, sendo que não se cometem erros ao analisá-las individualmente.

As amostras desidratadas em spray e o resíduo da câmara de secagem possuem características funcionais um pouco diferentes, sendo mais acentuada na solubilidade. A solubilidade da amostra e do resíduo apresentou uma diferença

de 6,35% e as variáveis influenciaram em intensidades e maneiras opostas, sendo que a temperatura demonstrou um efeito maior sobre o resíduo e o pH sobre a amostra original. A capacidade de emulsificação do resíduo também foi um pouco menor mas esta diferença manteve-se em 2%, em média.

As equações usadas para predizer as curvas obtidas para o planejamento dos ensaios de solubilidade e de capacidade de emulsificação foram bem ajustadas de acordo com os métodos de validação usados (Teste F e coeficiente de regressão).

6.4 Referências Bibliográficas

DE KANTEREWICZ, R.J., ELIZALDE, B.E., PILOSOF, A.M.R., BARTHOLOMAI, G.B. Water-oil absorption index (WOAI): a simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.5, p.1381-1383, 1987.

MORR, C.V., GERMAN, B., KINSELLA, J.E., REGENSTEIN, J.M., VAN BUREN, J.P., KILARA, A., LEWIS, B.A., MANGINO, M.E. A collaborative study to develop a standartized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, n.6, p. 1715-1718, 1985.

Capítulo 7. Considerações finais

7.1 Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho sobre a recuperação de proteínas a partir do soro de sangue bovino e a caracterização voltada para a aplicação desta proteína em uma indústria alimentícia, permite tirar as seguintes conclusões:

1. As frações obtidas, BSA e GB, apesar de apresentarem mesma quantidade de proteínas, suas proteínas possuem estruturas diferentes e isto interfere em suas propriedades funcionais.
2. A BSA apresentou excelente solubilidade em todas as variáveis estudadas indicando estabilidade estrutural, provavelmente devido sua conformação globular serem mantidas pelas 17 pontes dissulfeto que a compõe.
3. A GB, pode ser usada para a elaboração de produtos alimentícios sob certas restrições de pH, pois como a maioria das proteínas exibe uma faixa de baixa solubilidade na faixa isoelétrica que corresponde a pH de 5 a 6.
4. As duas frações mostraram capacidade de formação de espuma igual e, em algumas condições, superiores à da proteína da clara de ovo, mostrando

5. serem potenciais substitutos para esta proteína cara e com muitos riscos de contaminação por *salmonella*.

7.2 Sugestões para trabalhos futuros

Este trabalho focalizou a precipitação bruta da proteína do sangue bovino (albuminas e globulinas) para verificar seu potencial quanto às suas propriedades funcionais e nutricionais. Como sugestão para um posterior trabalho fica explorar técnicas de purificação deste produto e medidas de sua atividade biológica, já que a BSA possui muitas pontes dissulfeto, responsáveis pela formação da glutathione.

O trabalho cobriu muito bem as propriedades funcionais das proteínas porém não houve uma aplicação destas frações na formulação de um produto. Seria interessante um trabalho que abrangesse desde a formulação até as avaliações sensoriais dos produtos para verificar mudanças de sabor e cor nos produtos. Lembrando-se que a BSA é uma proteína que dependendo do tratamento dispensado, vale \$955,00 o quilo.

Anexo

7.2.1 Planejamento fatorial completo para a solubilidade

A Tabela 19 mostra a matriz de planejamento com as respostas de solubilidade para a amostra seca em spray e seu resíduo. Os pontos centrais representam a triplicata do ensaio, e geralmente predizem o erro experimental.

Tabela 19. Planejamento fatorial completo para a solubilidade da BSA em função do pH, da concentração salina e da temperatura.

	pH	NaCl (M)	T(°C)	Resíduo	Spray
1	3	0,05	25	95,00	99,84
2	7	0,05	25	83,98	98,37
3	3	0,15	25	98,00	98,82
4	7	0,15	25	76,32	97,28
5	3	0,05	45	97,00	99,72
6	7	0,05	45	95,00	98,42
7	3	0,15	45	95,31	98,55
8	7	0,15	45	95,31	97,16
9	2,58	0,1	35	99,53	99,38
10	7,42	0,1	35	91,00	98,43
11	5	0	35	90,78	99,00
12	5	0,16	35	94,67	98,61
13	5	0,1	22,9	87,35	98,07
14	5	0,1	47,1	89,94	98,27
15	5	0,1	35	92,26	98,46
16	5	0,1	35	91,28	98,32
17	5	0,1	35	93,42	98,64

A análise da variância para os ensaios de solubilidade realizados está representada na Tabela 20 e Tabela 21. Nota-se que para o modelo adotado, o coeficiente de correlação das duas amostras não foram bons, apesar de ter sido um pouco melhor para a BSA (0,93) que para seu resíduo (0,90). Este coeficiente indica que 93 e 90% dos dados obtidos ajustaram-se aos valores previstos pelo modelo. Isto pode ser melhor visualizado na Figura 36 e Figura 37.

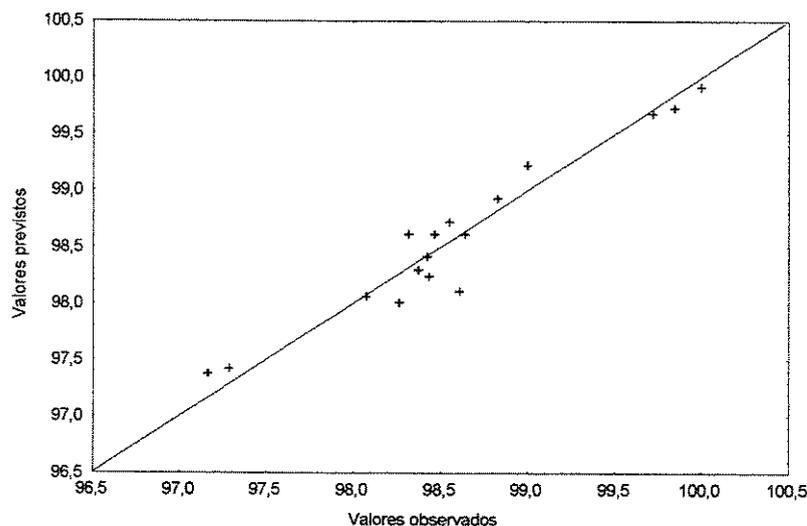


Figura 36. Valores observados e previstos para a BSA.

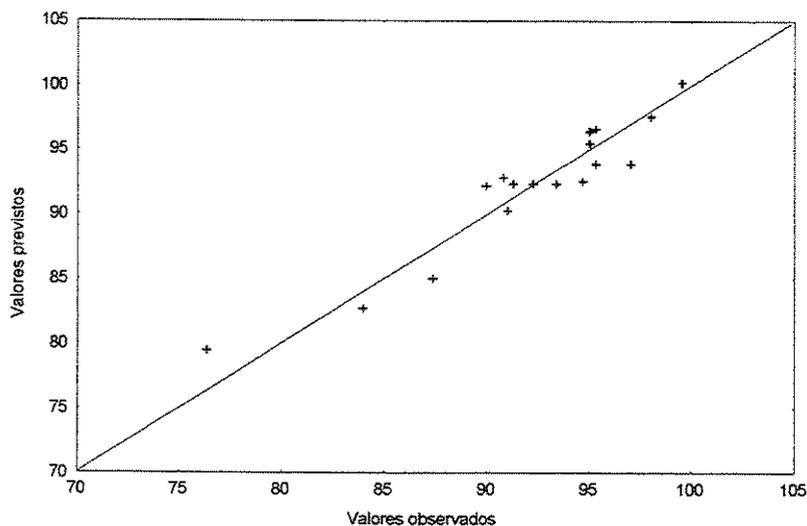


Figura 37. Valores observados e previstos para o resíduo.

Outro teste de validação do modelo é o teste F que equivaleu a um fator cinco e dez em relação ao tabelado para o resíduo e para a BSA, respectivamente, a um nível de confiança de 95%, mostrando que a equação

ajustada é estatisticamente significativa. Isto indica que a quantidade de variação devido ao modelo ajustado é superior à variação não explicada, mostrando que os valores experimentais podem ser representados pelo modelo.

Tabela 20. Anova para o planejamento fatorial completo da solubilidade da BSA.

	SOMA QUADRATICA	GRAU DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRATICA	TESTE F
<i>REGRESSAO</i>	8,69	4	2,1725	38,33824
<i>RESIDUO</i>	0,68	12	0,056667	
<i>F AJUSTE</i>	0,63	10		
<i>ERRO PURO</i>	0,05	2		
<i>TOTAL</i>	9,37	16		

Coeficiente de regressão: 0,93
F tabelado (95%, 9,7): 3,26

Tabela 21. Anova para o planejamento fatorial completo da solubilidade do resíduo da BSA.

	SOMA QUADRATICA	GRAU DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRATICA	TESTE F
<i>REGRESSAO</i>	423,9426	4	105,9856	15,57086
<i>RESIDUO</i>	81,68	12	6,806667	
<i>F AJUSTE</i>	79,39	10		
<i>ERRO PURO</i>	2,29	2		
<i>TOTAL</i>	505,6226	16		

Coeficiente de regressão: 0,90
F tabelado (95%, 9,7): 3,26

A média quadrática é uma medida aproximada do erro médio cometido ao utilizar-se uma equação de regressão para prever a resposta. Portanto, a divisão da média quadrática da regressão pela do resíduo (teste F), indica quão próxima do ideal está o experimento. Quanto maior o F calculado estiver em relação ao tabelado, mais próximo os resultados observados estarão do previsto.

7.2.2 Planejamento fatorial completo para a capacidade de formação de emulsão

O planejamento fatorial completo 2^2 com três pontos centrais e dois axiais foi realizado para a capacidade de formação de emulsão da BSA e do resíduo em spray e está apresentado na Tabela 22. Nas colunas spray e resíduo estão os resultados obtidos experimentalmente pela combinação de pH e concentração salina, aqui sob forma codificada e cujos valores reais estão apresentados na Tabela 19. Foram escolhidas as variáveis pH e concentração de NaCl pois mostraram ter influência na CE da proteína liofilizada

Tabela 22. Planejamento fatorial completo para a capacidade de formação de emulsão da BSA em função do pH e concentração salina.

	pH	NaCl	spray	resíduo
1	-1	-1	551,23	489,84
2	1	-1	499,30	465,34
3	-1	1	487,32	503,71
4	1	1	519,27	497,18
5	0	0	567,21	546,98
6	0	0	568,00	546,08
7	0	0	559,22	538,82
8	-1,21	0	566,41	522,49
9	1,21	0	487,32	538,82
10	0	-1,21	567,21	538,82
11	0	1,21	600,00	550,00

Este ensaio apresentou excelentes resultados de validação, pois quanto maior a fração descrita pela regressão, melhor o ajuste do modelo e a anova para o resíduo apresentou um coeficiente de regressão de 96% e o da BSA de 89%.

Tabela 23. Anova para o planejamento fatorial completo da Capacidade de emulsificação da BSA.

	SOMA QUADRÁTICA	GRAU DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
REGRESSÃO	12440,18	3	4146,73	16,29
RESÍDUO	1781,82	7	254,55	
F AJUSTE	1738,00	5		
ERRO PURO	43,82	2		
TOTAL	14222,00	10		

Coeficiente de regressão: 0,87; F tabelado (95%, 3,7): 4,35

Tabela 24. Anova para o planejamento fatorial completo da capacidade de emulsificação do resíduo da BSA.

	SOMA QUADRÁTICA	GRAU DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
REGRESSÃO	7551,15	2	3775,58	57,65
RESÍDUO	523,93	8	65,49	
F AJUSTE	479,50	6		
ERRO PURO	44,43	2		
TOTAL	8075,09	10		

Coeficiente de regressão: 0,94; F tabelado (95%, 3,7): 4,35

As Figuras 38 e 39 mostram os valores experimentais em relação ao modelo previsto pelo planejamento.

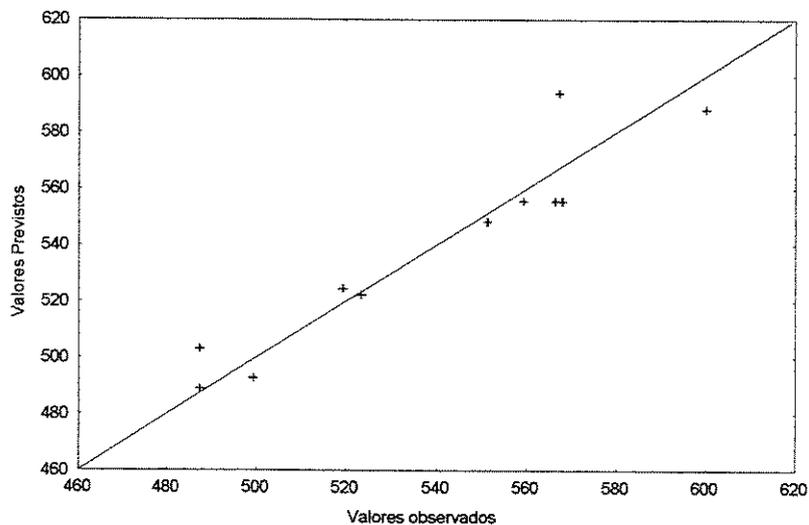


Figura 38. Valores previstos e observados para a capacidade de emulsificação da BSA.

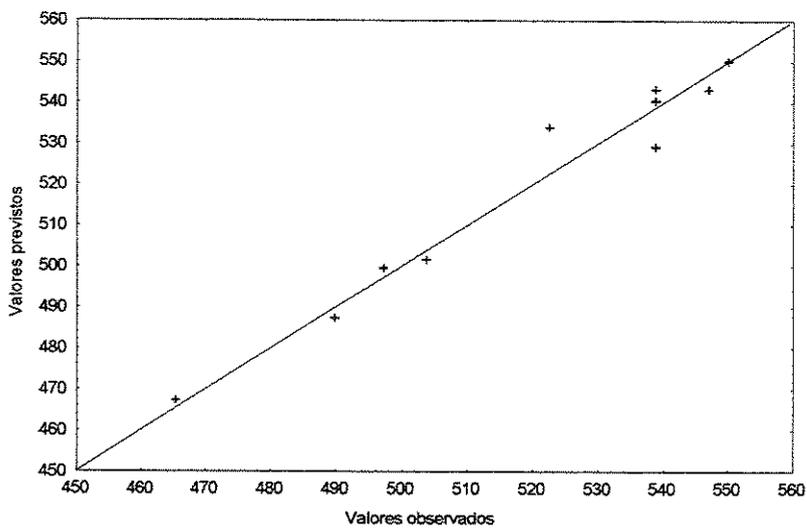


Figura 39. Valores previstos e observados para a capacidade de emulsificação do resíduo da BSA.