



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE ISOLADO PROTEICO PROVENIENTE DE SUBPRODUTOS DA
INDÚSTRIA DE AVES EM DIFERENTES ESCALAS**

CLAUDIO GABIATTI JUNIOR

Engenheiro de Alimentos

PROF. DR. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ

Orientador

Rio Grande, RS.

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE ISOLADO PROTEICO PROVENIENTE DE SUBPRODUTOS DA
INDÚSTRIA DE AVES EM DIFERENTES ESCALAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

CLAUDIO GABIATTI JUNIOR
Engenheiro de Alimentos

PROF. DR. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ
Orientador

Rio Grande, RS.

2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Claudio Gabiatti e Maria da Graça Pias Gabiatti, exemplos de perseverança e símbolos da educação a mim exemplar, sem os quais, não alcançaria este momento único.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández pela amizade, conhecimento, sabedoria e confiança dada neste trabalho.

Aos meus pais Claudio Gabiatti e Maria da Graça Pias Gabiatti e ao meu irmão Alexandre Gabiatti pela paciência e tranquilidade a mim trazidos, incentivando diariamente para o meu melhor desenvolvimento.

À Dr. Michele Moraes de Souza por toda dedicação, compreensão, ensinamentos, paciência e incentivo para a melhor realização deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, cada um em sua característica específica, as quais sem o total somatório delas, não seria possível: incentivo, consolo, amizade, alegria, diversão, conhecimento, sabedoria e o melhor ambiente possível para se desenvolver pessoal e profissionalmente.

Aos técnicos Sabine e Roque e a secretária Islanda, por toda amizade e préstimos realizados nestes dois anos de mestrado.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Eliana Badiale Furlong, Jaqueline Garda Buffon e Leonor Almeida de Souza Soares, pela paciência e ensinamentos no decorrer de todo desenvolvimento proposto para este trabalho.

Ao amigo Med. Vet. José Augusto Reis Nunes por toda ajuda e principalmente por todo conhecimento disponibilizado por ele a este trabalho.

Ao amigo Sandro Luis Leonardo, gerente industrial da Companhia Minuano de Alimentos, por todo conhecimento disponibilizado durante toda minha atuação como profissional desta empresa, bem como pelo fornecimento de informações e materiais para a produção deste trabalho.

Aos alunos Bruno Freire, Helen Rodrigues e Giordan Fernandes pela amizade e colaboração em todos os experimentos realizados.

RESUMO

PRODUÇÃO DE ISOLADO PROTEICO PROVENIENTE DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE AVES EM DIFERENTES ESCALAS

A indústria de aves brasileira destaca-se economicamente, onde um total de 12,3 milhões de toneladas foi produzido no país em 2013. Esta produção em larga escala gera considerável volume de subprodutos, chegando até 35% da ave viva. Tais resíduos são convertidos, por processos tradicionais, em produtos de baixo valor comercial, como por exemplo, farinhas. O processo de variação de pH constitui um importante processo alternativo de obtenção de proteínas com melhores características funcionais e nutricionais. Estudar as variáveis do processo, efetuando aumento dimensional, é fundamental para aplicação das tecnologias desenvolvidas no laboratório e posterior definição final de processos industriais. A produção de isolados proteicos seria uma tecnologia atraente no aproveitamento de subprodutos da indústria de frango, convertendo-os em uma ótima fonte proteica, agregando valor ao produto obtido. Este trabalho teve por objetivo produzir isolados proteicos em diferentes escalas, utilizando subprodutos não comestíveis da indústria de frango. Foi estudada a solubilização das proteínas da matéria-prima (MP) para definir pHs de solubilização e de precipitação isoelétrica. A curva apontou um pH alcalino de 11,0 para etapa de solubilização e de 5,25 para etapa de precipitação proteica. As proteínas obtidas foram caracterizadas quanto sua composição proximal, índice de acidez (IA), índice de peróxidos (IP) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) além de propriedades funcionais de solubilidade, capacidade de retenção de água (CRA) e capacidade de retenção de óleo (CRO); e nutricionais de digestibilidade proteica. Comparativamente foram analisadas farinhas de vísceras comerciais nos mesmos parâmetros. Um aumento de escala do processo foi realizado e avaliado pelas mesmas respostas do produto da escala laboratorial. Foi obtido um teor proteico de 82 e 85% em escala laboratorial e aumento de escala, respectivamente, e também uma redução lipídica de 75%, e de cinzas de 85%, em relação à MP. A composição proximal das farinhas analisadas ficou entre 67-72% para proteína bruta, 17-22% para lipídios e 9-15% para cinzas. O IA, apresentou valores de 2,2 e 3,1 meq/g de isolado e de 1,6 a 2,0 meq/g de farinha. Já para IP, obteve-se valores de 0,003 a 0,005 meq/g de isolado e de 0,002 a 0,049 meq/g de farinha. Os índices de TBARS apontaram valores de 0,081 e 0,214 mg MA/g de isolado e 0,041 a 0,128 mg MA/g de farinha. A solubilidade das proteínas do isolado apontou 84 e 81% em pH 3 e 11 respectivamente e de 5% em pH 5, já para farinhas variaram de 22 a 31% em pH de 3 a 11. A CRA obtida no isolado foi 3,1 a 16,5 g água/g de proteína e de 3,8 a 10,9 g água/g de proteína nas farinhas. A CRO ficou em 4,2 mL de óleo/g de proteína do isolados e 2,6 mL de óleo/g de proteína da farinhas. Os isolados proteicos apresentaram 92 e 95% de digestibilidade das proteínas, em comparação aos 84% das farinhas comerciais. Os índices acumulados e apresentados neste trabalho concluíram que foi possível aumentar a escala do processo de variação de pH, sem perder qualidade nos índices físico-químicos e de digestibilidade proteica.

Palavras-chave: aumento de escala, farinha de vísceras, frango, proteínas, variação do pH.

ABSTRACT

PROTEIN ISOLATE PRODUCTION FROM CHICKEN INDUSTRY BYPRODUCTS IN DIFFERENT SCALE

Brazilian meat industry stands out economically, estimating that a total of 12.3 million tons were produced in the country in 2013. The large scale production generates a considerable amount of byproducts, reaching 35% of the live weight of chicken. These byproducts are converted, which by conventional methods, into low commercial value products, such as meals. The pH-shifting process appears an interesting alternative process to obtain protein with better functional and nutritional values. Studying the process variables effecting dimensional increase is essential to apply the new technologies developed in laboratories and further final definition of the industrial process. The production of protein isolates would be an interesting technology to use the chicken byproducts, converting them into optimal protein source, adding value to the product. This study aimed to produce protein isolates in different scales, using inedible chicken byproducts. A solubilization curve of the proteins was performed to set the pH value of solubilization and isoelectric precipitation. This curve defined a alkaline pH of 11,0 for the solubilization step and 5,25 for the isoelectric precipitation step. The obtained proteins were characterized for their composition, acidity index (IA), peroxide index (IP) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), such as functional properties as solubility, water holding capacity (CRA) and oil holding capacity (CRO); and nutritional as protein digestibility. Compared, commercial viscera flours were analyzed against the same parameters. A scale-up was performed and evaluated as the same responses for the product obtained in the laboratory scale. There was obtained a protein content of 82 and 85% for lab-scale and scaling, respectively, and also a reduction of lipid to 75% and 85% to ash content, with respect to the raw material. The proximal composition of the viscera flour was between 67-72% for crude protein, 17-22% for lipid and 9-15% for ash. The IA presents values of 2,2 and 3,1 meq/g of isolate and 1,6 to 2,0 meq/g of flour. The IP observes values of 0,003 and 0,005 meq/g of isolate and 1,6 to 2,0 meq/g for the flour. TBARS shows values of 0,081 and 0,214 mg MA/g of isolate and 0,041 to 0,128 mg MA/g of flour. The solubility of isolates presents 84 and 81% in pH 3 and 11 respectively and 5% in pH 5, for the flour this varies from 22 to 31% in pH 3 to 11. The CRA obtained for the isolates was 3,1 to 16,5 g of water/g of protein and 3,8 to 10,9 g of water/g of protein in the flours. The CRO was in 4,2 mL of oil/g of protein in the isolates and 2,6 mL of oil/g of protein in the flours. The isolates presents 92 to 95% of protein digestibility, in comparison of 84% for the commercial flours. The cumulative indexes and presented in this study concluded that it was possible to increase the scale of pH shifting process without losing quality in the physical-chemical contents and protein digestibility.

Key-words: scale-up, viscera meal, chicken, proteins, pH shifting.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Padrões físico-químicos para farinha de vísceras de frango.	8
Tabela 2 – Produção estimada de coprodutos de aves.	8
Tabela 3 – Relação aminoácido/lisina utilizada para estimar exigências de aminoácidos de frangos de corte.....	23
Tabela 4 – Padrão recomendado de aminoácidos essenciais para as proteínas alimentares. ..	23
Tabela 5 – Composição em percentual da matéria-prima utilizada para produção de isolado.	25
Tabela 6 – Variáveis utilizadas no planejamento experimental para obtenção do isolado proteico de frango.	32
Tabela 7 – Gradiente de separação para a eluição dos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa)	37
Tabela 8 – Composição proximal do subproduto da extração da carne mecanicamente separada de frango e do isolado proteico obtido a partir desta.....	39
Tabela 9 – Composição proximal das farinhas de vísceras comerciais em base seca.	40
Tabela 10 – Índices qualitativos das farinhas de vísceras de frango comerciais.	41
Tabela 11 – Resultados obtidos junto à indústria para rendimentos do abate de frango.	42
Tabela 12 – Composição proximal da matéria-prima incluindo as vísceras.	43
Tabela 13 – Composição do subproduto utilizado como matéria-prima para produção de isolado proteico de frango.	45
Tabela 14 – Composição proximal e índices de qualidade da matéria-prima (cabeças, cortes condenados no processo de abate e resíduo da extração da carne mecanicamente separada).	45
Tabela 15 – Valores obtidos para rendimento de massa e de proteína no processo de isolamento proteico.	49
Tabela 16 – Composição proximal em base seca da matéria-prima, das farinhas comerciais e do isolado proteico de frango obtido em bancada.	51
Tabela 17 – Índices qualitativos da matéria-prima, das farinhas comerciais e do isolado proteico de frango obtido em bancada.	52
Tabela 18 – Digestibilidade proteica e capacidade de retenção de óleo obtido para isolado proteico de frango obtido em bancada e farinha comercial da amostra A.	57
Tabela 19 – Perfil de aminoácidos para isolado proteico de frango obtido em bancada e farinha comercial da amostra A (em mg Aminoácido/g de proteína).	58
Tabela 20 – Composição proximal do isolado proteico de frango adicionado de cloreto de sódio na solubilização das proteínas.	60
Tabela 21 – Resultados obtidos na produção de isolado proteico de frango no delineamento 2 ² proposto.	61
Tabela 22 – Tabela de efeitos para proteína seca em função da velocidade de centrífuga e do tempo de centrifugação.	62
Tabela 23 – Verificação da validade estatística do modelo proposto na equação 9 para proteína seca.	63

Tabela 24 – Tabela de efeitos para lipídios base seca em função da velocidade centrífuga e do tempo de centrifugação.	65
Tabela 25 – Verificação da validade estatística do modelo proposto na equação 10 para lipídios seca.	65
Tabela 26 – Valores obtidos para rendimento de massa e proteico do isolado proteico obtido em escala.	68
Tabela 27 – Composição proximal da matéria-prima, isolado proteico de frango obtido em bancada e isolado proteico de frango obtido em escala.	69
Tabela 28 – Índices qualitativos da matéria-prima, isolado proteico de frango obtido em bancada e isolado proteico de frango obtido em escala.	70
Tabela 29 – Digestibilidade proteica obtida para isolado proteico de frango obtido em bancada e isolado proteico de frango obtido em escala.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxo de processamento de aves e pontos de geração de subprodutos.	7
Figura 2 – Diagrama do processamento de coprodutos do abate de aves.	10
Figura 3 – Curva de solubilização de proteínas musculares de pescado (miofibrilares e sarcoplasmáticas) afetadas pelo pH e força iônica (IS)	14
Figura 4 – Esquema do processo e equipamentos do processo de variação do pH.	18
Figura 5 – Fluxograma do processamento em bancada de obtenção de isolado proteico.	29
Figura 6 – Equipamentos utilizados para o processo de variação de pH.	30
Figura 7 – Isolado proteico obtido com a matéria-prima contendo vísceras de frango.	44
Figura 8 – Subproduto utilizado para processamento de isolado proteico de frango.	45
Figura 9 – Curva de solubilização de proteínas da matéria-prima x pH do meio	47
Figura 10 – Reator e isolado proteico úmido obtido no processo proposto.	49
Figura 11 – Curva de solubilidade para isolado proteico de frango obtido em bancada e farinha comercial da amostra A.	55
Figura 12 – Capacidade de retenção de água apresentada para isolado proteico de frango obtido em bancada e farinha comercial da amostra A.	56
Figura 13 – Tubos contendo baixa proteína precipitada do isolado proteico de frango adicionado de cloreto de sódio na solubilização das proteínas.	60
Figura 14 – Superfície de contorno da proteína seca em função do tempo de centrifugação (minutos) e da velocidade centrífuga (xg).	64
Figura 15 – Superfície de contorno do lipídio seco em função do tempo de centrifugação (minutos) e da velocidade centrífuga (xg).	66
Figura 16 – Equipamento utilizado para aumento de escala do processo de isolado proteico de frango.	67
Figura 17 – Isolados proteicos de subprodutos de frango obtidos em escala (A) e bancada (B).	68

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Solubilidade da proteína.....	33
Equação 2 – Rendimento de massa.....	34
Equação 3 – Rendimento proteico	34
Equação 4 – Índice de acidez	34
Equação 5 – Índice de peróxidos	35
Equação 6 – Capacidade de retenção de água (CRA)	36
Equação 7 – Capacidade de retenção de óleo (CRO)	36
Equação 8 - Digestibilidade	37
Equação 9 – Regressão para %PS	63
Equação 10 – Regressão para %LS	65

ABREVIATURAS

Dig. = Digestibilidade

EQA = Escola de Química de Alimentos

FA = farinha de vísceras

FURG = Universidade Federal do Rio Grande

ICR = Índice de Conversão Residual

IPF = isolado proteico de frango

IPFB = isolado proteico de frango em bancada

IPFE = isolado proteico de frango em escala

IS = força iônica

LPP = Laboratório de Processamento de Pescado

LTA = Laboratório de Tecnologia de Alimentos

M = molar

MP = matéria-prima

NaCl = Cloreto de Sódio

Na₂SO₄ = Sulfato de Sódio

PI = ponto isoelétrico

pH = potencial hidrogeniônico

PS = ponto de solubilização

RIISPOA = Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

ROA = resíduos de origem animal

TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	vxiii
LISTA DE TABELAS	1
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE EQUAÇÕES	xiv
ABREVIATURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Geral.....	3
2.2 Específicos.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Avicultura Brasileira	4
3.1.1 Subprodutos não comestíveis	6
3.1.2 Farinha de vísceras de frango	7
3.1.3 Processamento da Farinha de Vísceras	9
3.2 Proteínas	11
3.2.1 Solubilidade das proteínas.....	12
3.2.2 pH das proteínas	14
3.2.3 Força iônica	15
3.3 Processo de isolamento das proteínas	16
3.4 Propriedades funcionais e nutricionais	20
3.4.1 Solubilidade.....	20
3.4.2 Capacidade de retenção de água (CRA)	21
3.4.3 Capacidade de retenção de óleo (CRO).....	21
3.4.4 Digestibilidade das proteínas.....	21
3.5 Aumento de escala	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Matéria-prima (MP).....	25
4.2 Infraestrutura	25
4.3 Procedimento experimental.....	26
4.4.1 Organização do trabalho	26
4.4.2 Equipamentos	27
4.4.3 Testes preliminares	27
4.4.4 Preparo da matéria-prima.....	28
4.4.5 Processo de extração das proteínas.....	28
4.4.6 Avaliação da centrifugação no processo de extração das proteínas	31
4.4.7 Aumento de escala no processo de variação do pH.....	32
4.4 Metodologia analítica.....	33
4.4.1 Solubilidade das proteínas.....	33
4.4.2 Avaliação de sais no processo	33

4.4.3	Rendimento do processo	34
4.4.4	Composição Proximal.....	34
4.4.5	Índice de Acidez	34
4.4.6	Índice de Peróxidos.....	35
4.4.7	Índice de substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	35
4.4.8	Solubilidade do IPF e Capacidade de Retenção de Água (CRA).....	35
4.4.9	Capacidade de retenção de óleo (CRO)	36
4.4.10	Perfil de aminoácidos.....	36
4.4.11	Digestibilidade das proteínas.....	37
4.6	Análise estatística	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	Testes preliminares	39
5.2	Farinha de Vísceras.....	40
5.3	Composição do subproduto em relação ao peso vivo e caracterização físico-química	42
5.3.1	Produção preliminar de IPF em bancada	44
5.4	Solubilização das proteínas	46
5.5	Produção de IPF em bancada (IPFB).....	48
5.5.4	Avaliação físico-química.....	50
5.5.5	Avaliação funcional e nutricional	54
5.6	Influência de sais no processo de isolamento.....	59
5.7	Planejamento experimental – centrifugação I	61
5.7.1	Delineamento fatorial composto.....	62
5.8	Aumento de processo	66
5.8.1	Avaliação físico-química do isolado proteico	69
5.8.2	Avaliação nutricional do IPFE.....	71
6.	CONCLUSÕES	72
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	74
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

O setor agroindustrial brasileiro vem intensamente contribuindo nos últimos anos para a manutenção e o crescimento econômico de nosso país. As indústrias processadoras de frango no Brasil têm aumentado seus volumes produtivos e, por consequência deste aumento, uma maior geração de subprodutos originários do abate é verificada. Aproximadamente 35% do animal produzido não são utilizados para consumo por humanos, tais como vísceras, pulmões, cabeças e carcaças condenadas, sendo denominados subprodutos. ABRA (2012) comenta que o aproveitamento de partes não comestíveis de produtos originários do abate de animais foi a primeira atividade de reciclagem de resíduos na história humana.

Para que o setor avícola mantenha-se lucrativo, é preciso investir em tecnologias e produtividade a baixo custo. Aliado a isto, atenção especial é necessária na questão ambiental, destacando-se a importância do aproveitamento dos subprodutos da indústria avícola. Através disso, é certo afirmar que a ausência do setor de reciclagem de Resíduos de Origem Animal (ROA), inviabilizaria toda a cadeia de produção industrial de aves.

A farinha de vísceras resultante do processamento de subprodutos de frango é um suprimento alimentar rico em nutrientes, constituído de proteínas de alto valor biológico, sais minerais e vitaminas do complexo B (COSTA, ROMANELLI e TRABUCCO, 2008). No processamento clássico, os subprodutos são submetidos a uma hidrólise, utilizando geralmente calor, combinado ou não com pressão, em digestores fechados. Estes fatores apresentam um alto risco para acidentes, além de apresentarem um custo elevado de produção, necessitando caldeiras e bombas para fechamento de pressão. Também podemos apontar que a temperatura e o tempo excessivo podem alterar irreversivelmente a qualidade nutricional das proteínas obtidas por este processo.

Estudar novos processos e novas utilizações dos subprodutos torna-se necessário, não apenas em razão do seu efeito poluente, mas também na busca por produtos economicamente viáveis e eficientes. As proteínas são moléculas essenciais para organismos animais, portanto devem estar presentes na alimentação em quantidades elevadas. Deve-se levar em conta não só o aspecto quantitativo, mas também o qualitativo, relacionado ao seu valor nutricional, que dependerá de sua composição, digestibilidade, biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, ausência de toxicidade e de fatores antinutricionais (VILLALVA, 2008).

A não ser que se esteja adaptando um novo processo a partir de um já existente, um processo industrial é pesquisado em laboratórios de universidades e centros de pesquisa e privados. Os estudos conduzidos em laboratório ou “escala de bancada” se caracterizam por reduzidos volumes e geram resultados sólidos e confiáveis, que permitem afirmar que a tecnologia é promissora. Já os estudos em aumento de escala ou "escala piloto" são caracterizados pelo aumento dimensional de quantidades no processo, realizando o desenvolvimento do processo a ser transposto em aumento de escala, de forma verificar a viabilidade técnica e econômica da tecnologia proposta.

Na década de 90 do século passado, houve o desenvolvimento de uma metodologia promissora para isolamento de proteínas de pequenos pescados pelágicos, denominado de processo de variação de pH ou “*pH shifting process*” que consiste basicamente em solubilizar as proteínas em meio ácido/alcalino e por separação física, extrair do meio quantidades de lipídeos, ossos e peles. Finalizando o processo, o meio é ajustado ao pH do ponto isoelétrico (PI), tornando as proteínas insolúveis e plausíveis de separação física. O processo químico é considerado limpo, não sendo necessária a utilização de fatores físicos como cocção e pressão, para obtenção das proteínas livres.

Isolados proteicos podem ser obtidos de diversas matérias-primas, tais como soja, feijão, girassol, leite, carnes, pescado e outros. Podem ser utilizados como ingrediente em produtos alimentares ou ainda utilizado para consumo diretamente pelos animais. Nos últimos anos, o uso de proteínas nas formulações de novos produtos alimentícios ou em alimentos convencionais tem sido foco de muitas pesquisas.

A produção e caracterização de isolado proteico proveniente de subprodutos do abate de aves representaria uma grande contribuição no sentido de se aproveitar ao máximo o recurso disponível, apresentando uma forma de processamento de menor agressão às proteínas disponíveis neste subproduto, ofertando uma fonte proteica de valor nutricional e funcional melhor em relação ao produto tradicional farinha de vísceras. Em face disto, este trabalho teve por objetivo produzir e avaliar um isolado proteico proveniente de subprodutos não comestíveis da industrialização de frango em diferentes escalas de processo.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Produzir isolado proteico utilizando subprodutos não comestíveis da indústria de abate de frango em diferentes escalas do processo.

2.2 Específicos

- Compor os percentuais de subprodutos denominados de não comestíveis, no processo de industrialização de frango em relação ao peso de carcaça do animal vivo.
- Caracterizar a farinha de vísceras (FA), produto comercial obtido convencionalmente do processamento destes subprodutos.
- Elaborar curva de solubilização das proteínas presentes na matéria-prima utilizada.
- Produzir isolado proteico em escala laboratorial utilizando os subprodutos não comestíveis da industrialização de frango, caracterizando o produto obtido.
- Avaliar o processo de centrifugação do processo de isolamento sugerido.
- Produzir isolado proteico em escala piloto utilizando os subprodutos não comestíveis da industrialização de frango e caracterizar o produto obtido.

3. REVISÃO DA LITERATURA

A demanda mundial por alimentos tem aumentado proporcionalmente ao crescimento populacional, que, embora em ritmo mais lento que no passado, deverá ultrapassar 9 bilhões de pessoas em 2050. Estimativas recentes indicam que, para atender a demanda projetada, a produção alimentar terá de aumentar em 60% a partir dos níveis mensurados em 2007 (FAO, 2013).

Proteínas são consideradas os mais importantes macronutrientes para alimentação humana, porém a má nutrição mundial por proteínas é considerada um problema, especialmente em países em desenvolvimento. Recentemente, o interesse no potencial de utilização de fontes subutilizadas, como biomassas, vegetais e subprodutos industriais, para obtenção de proteínas, tem aumentado (HAN, CHEN e CHO, 2015).

Na última década, a avicultura brasileira tem apresentado altos índices de crescimento, passando de 6 milhões em 2000 para 12,3 milhões de toneladas em 2013. Além de frango, outras aves, como peru e avestruz, também têm se destacado ultimamente, contribuindo para diversificar os produtos de exportação do agronegócio brasileiro (BRASIL, 2013).

3.1 Avicultura Brasileira

Segundo dados da União Brasileira de Avicultura (UBABEF, 2014), a produção de carne de frango chegou a 12,3 milhões de toneladas em 2013. O Brasil manteve a posição de maior exportador mundial e de terceiro maior produtor de carne de frango, atrás dos Estados Unidos e da China. Do volume total de frangos produzido pelo país, 68,4% foi destinado ao consumo interno, e 31,6% para exportações. Com isto, no ano de 2013, o consumo per capita de carne de frango no Brasil atingiu 41,8 quilos por pessoa.

Conforme os dados da UBABEF (2014), a produção mundial de frangos alcançou a marca de 82.178 mil toneladas, atendendo o consumo mundial da carne de aves, porém esta revolução nos hábitos de consumo não foi nada casual. Schmidt (2008) aponta que fatores como a rapidez de crescimento das aves e o menor custo produtivo comparativamente ao de outras espécies animais de açougue traduzem-se em um preço mais acessível ao consumidor. Também destaca que as propriedades dietéticas (como possuir alto valor nutricional) e culinárias são características que reúnem perfeitamente vários requisitos alimentícios atuais, levando a carne de aves a um lugar preferencial no consumo habitual da sociedade moderna.

A grande evolução observada na produção de frangos de corte nas últimas décadas é fato marcante, definido, principalmente, pelo intenso desenvolvimento observado em sua nutrição. A união de diversas áreas trouxe inúmeros ganhos ao processo de criação de frangos, entendendo e utilizando as mais novas tecnologias em que se fala de nutrição, genética, instalações, equipamentos e manejo, tornando a produtividade mais efetiva e com ganhos para economia nacional (OLIVO, 2006).

Segundo Bernardi (2011), a crescente preocupação com o meio ambiente tem mobilizado diversos segmentos do mercado primário. O termo subproduto é amplamente utilizado, englobando não somente resíduos sólidos como também efluentes líquidos e materiais presentes nas emissões atmosféricas. Na cadeia produtiva de aves, as principais fontes de geração de resíduos são: o incubatório, o matrizeiro, o aviário e o frigorífico.

Os resíduos industriais, depois de gerados, necessitam de um destino adequado, pois não podem ser acumulados indefinidamente no local em que foram produzidos. Pelizer (2007) afirma que a disposição dos resíduos para o meio ambiente, por meio de emissões de matéria e de energia e/ou lançados na atmosfera, nas águas ou no solo, deve ocorrer após estes sofrerem algum tratamento adequado e serem enquadrados nos padrões estabelecidos na legislação ambiental para que não causem poluição.

Já Laufenberg et al. (2003) relatam que os subprodutos podem conter muitas substâncias de alto valor e, sendo empregada tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. Numerosas substâncias relacionadas ao processo de produção de alimentos são adequadas para separação e reciclagem. De acordo com os mesmos autores, é necessário um inventário completo, baseado numa visão holística da indústria de alimentos, contendo dados sobre ocorrência, quantidade e utilização dos resíduos.

No processo de incubação, ocorrem perdas de 8 a 12% dos ovos e, no processamento do frango de corte no abatedouro, essas perdas podem chegar até 35%, gerando uma quantidade significativa de resíduos que, por serem poluentes e contaminarem a água, o solo e o ar, tornaram-se a grande preocupação das organizações ambientais. Uma das formas de aproveitamento desses resíduos é o seu processamento, que origina produtos como as farinhas de vísceras, de penas, de carne e ossos, e de resíduo de incubatório, e que podem ser utilizados para alimentação animal (NUNES et al., 2005).

Abatedouros, frigoríficos e açougues geraram, em 2010, aproximadamente 65 kg de resíduos de origem animal (ROA) não destinados ao consumo humano para cada brasileiro, que foram processados, tratados, estabilizados e reaproveitados tanto na própria

cadeia de produção da carne como em outros setores, como o de higiene e energia (biocombustíveis) (ABRA, 2012).

3.1.1 Subprodutos não comestíveis

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 1952), entende-se por "subproduto não comestível" todo e qualquer resíduo devidamente elaborado, que se enquadre nas denominações e especificações deste Regulamento. Também expõe que é obrigatório o aproveitamento de carcaças, partes de carcaças e órgãos de animais condenados, varredura em geral, restos e recortes de todas as seções do estabelecimento, para o preparo de coprodutos não comestíveis.

O mesmo Regulamento define por "alimento para animais" todo e qualquer coproduto industrial usado na alimentação de animais, tais como: farinha de carne; farinha de sangue; sangue em pó; farinha de ossos crus; farinha de ossos autoclavados; farinha de ossos degelatinizados; farinha de fígado; farinha de pulmão; farinha de carne e ossos; rações preparadas. O manual de procedimento operacional padrão para o trânsito de subprodutos de origem animal, emissão de CIS-E e credenciamento de médicos veterinários particulares (BRASIL, 2009) conceitua como subproduto de origem animal todas as partes ou derivados oriundos de animais não destinados à alimentação humana.

Cerca de um terço até a metade do animal produzido para consumo (carne, leite, ovos, etc.) não é consumido pelos humanos, tais como intestinos, pulmões, cabeças, sendo denominados subprodutos. Estes subprodutos, apesar de não serem consumidos pelos humanos, podem ser processados e transformar-se em muitos subprodutos úteis. Farinha de carne e osso, farinha de sangue, farinha de vísceras de aves são alguns subprodutos resultantes destes processos de reaproveitamento, os quais são empregados principalmente em rações para indústria avícola, aquícola e de animais de estimação (FERNANDES, 2011).

O aproveitamento de partes não comestíveis de produtos originários do abate de animais e de recortes de açougues foi verdadeiramente a primeira atividade de reciclagem de resíduos de atividades humanas. O primeiro registro do uso de gorduras animais de que se tem notícia foi para a fabricação de sabões, no "Papiro de Ebers" (Egito, 1550 AC), época em que os antigos egípcios banhavam-se regularmente com um produto à base de óleos vegetais e gorduras animais combinados com sais alcalinos para formar um tipo de sabão (ABRA, 2012).

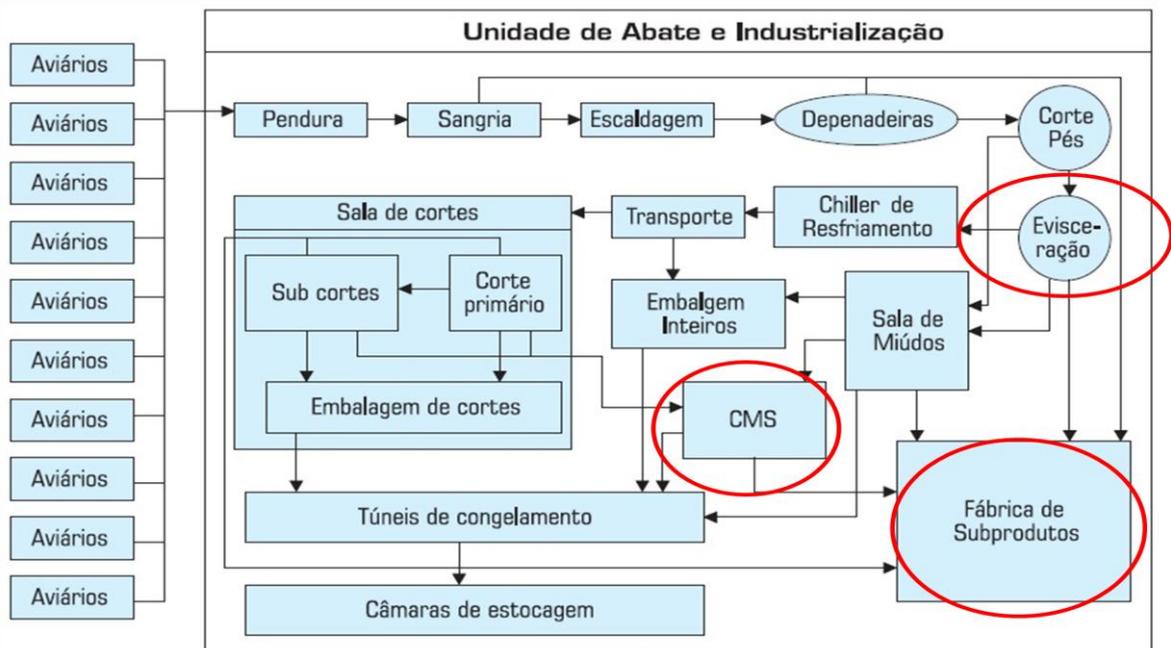
No início do século XX, o processamento consistia da injeção de vapor direto na matéria-prima, separando a água e a gordura do material sólido. A gordura era utilizada para a fabricação de margarinas, lubrificantes, velas e sabões; o resíduo sólido era utilizado como

fertilizante. Com o avanço tecnológico, o resíduo do processamento passou a ser produzido seco, em forma de farinha (ABRA, 2012).

Seguindo o histórico, ABRA (2012) afirma que, na década de 40, frangos de corte tiveram seu crescimento acelerado, quando receberam farinha de carne e ossos em suas dietas. A partir desta marca, o processamento de subprodutos do abate de aves começou então a ser difundido, com a fabricação de farinhas de vísceras e de penas. Entre 1960 e 1970, o uso de farinhas e gorduras de origem animal disseminou-se na produção animal. Animais que consumiam rações fabricadas com esses produtos cresciam mais rápido, consumiam menos ração e apresentavam custo de produção muito inferior aos que comiam apenas grãos.

A Figura 1 apresenta o fluxograma do processamento de aves em abatedouro, demonstrando as operações realizadas e os possíveis pontos de geração dos resíduos sólidos dos quais serão processadas as farinhas na fábrica de subprodutos.

Figura 1 – Fluxo de processamento de aves e pontos de geração de subprodutos.



Fonte: Cassel, Antunes e Oenning (2006).

3.1.2 Farinha de vísceras de frango

Segundo a legislação nacional (BRASIL, 1988), farinha de vísceras é definida como o produto resultante da cocção de vísceras de aves, sendo permitida a inclusão de cabeças e pés. Esta não deve conter outras matérias estranhas na sua composição, salvo naquelas quantidades inevitáveis nos bons métodos de processamento e deve ser isenta de micro-organismos patogênicos. Fernandes (2011) anexa a esta definição que não pode ser adicionado penas em seu processo produtivo, para que o produto final possua maior teor de

proteínas, caracterizando esta adição como adulteração. O teor de proteína pode variar de 55 a 65%, já que a composição e a qualidade da matéria-prima são variáveis (BELLAVAR, 2005). Para farinha de vísceras, são definidos como padrões físico-químicos os dados demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Padrões físico-químicos para farinha de vísceras de frango.

Especificação	Mínimo	Máximo
Umidade	-	8%
Proteína bruta	50%	-
Digestibilidade em pepsina 0,2%	75%	-
Acidez	-	6%
Matéria mineral	-	13%
Extrato etéreo	*	*

Fonte: BRASIL, 1988.

* O teor de extrato etéreo deve ser garantido em mínimo de acordo com o nível registrado no órgão competente do Ministério da Agricultura.

Através dos fatores de conversão descritos por Sabino e Finzer (2006), verificamos, na Tabela 2, dados produtivos referentes a farinhas de vísceras para o ano de 2012.

Tabela 2 – Produção estimada de coprodutos de aves.

Coprodutos	Aves Abatidas ¹	Massa Processada ¹	ICR ²		Produção de Coproduto ³		Média
			A	B	Índice A	Índice B	
	Mil Cabeças	Ton	g/ave	%	Toneladas	Toneladas	
Farinha de Vísceras			86	3,35	440.040	423.775	431.907
Farinha de Pena	5.163.265	12.300.000	84	3,24	433.714	409.860	421.787
Gordura de Frango			71	2,76	366.591	349.140	357.865
Total			241	9,35	1.240.345	1.182.775	1.211.560

¹ Dados extraídos e adaptados do relatório UBABEF (2014) referente ao abate para consumo interno + o abate para exportação, considerando estabelecimentos com serviço de inspeção federal (SIF).

² ICR, Índice de Conversão Residual, extraído de Sabino e Finzer (2006).

³ Estimativa realizada a partir dos índices de conversão de coproduto pelo número de aves (A) e massa processada (B).

Algumas correlações entre a composição e a qualidade das farinhas são descritas por Silva et al. (2011), sendo que a primeira correlação é a umidade com o aquecimento. É desejável que a umidade esteja entre 4 e 6%. Este parâmetro pode ser um indicativo de supraaquecimento ou subaquecimento. Já a fibra bruta é utilizada para verificar a presença de carboidratos contidos no trato gastrointestinal e é correlacionada a períodos curtos de jejum, não devendo ser superior a 2%, enquanto a matéria mineral e a proteína bruta apresentam-se correlacionadas de forma antagônica. Já os índices de acidez e de peróxidos indicam o grau da

hidrólise das gorduras e a formação de peróxidos na farinha, respectivamente. A presença destes compostos em alto nível pode levar a um estado de toxidez no animal ao ingeri-las.

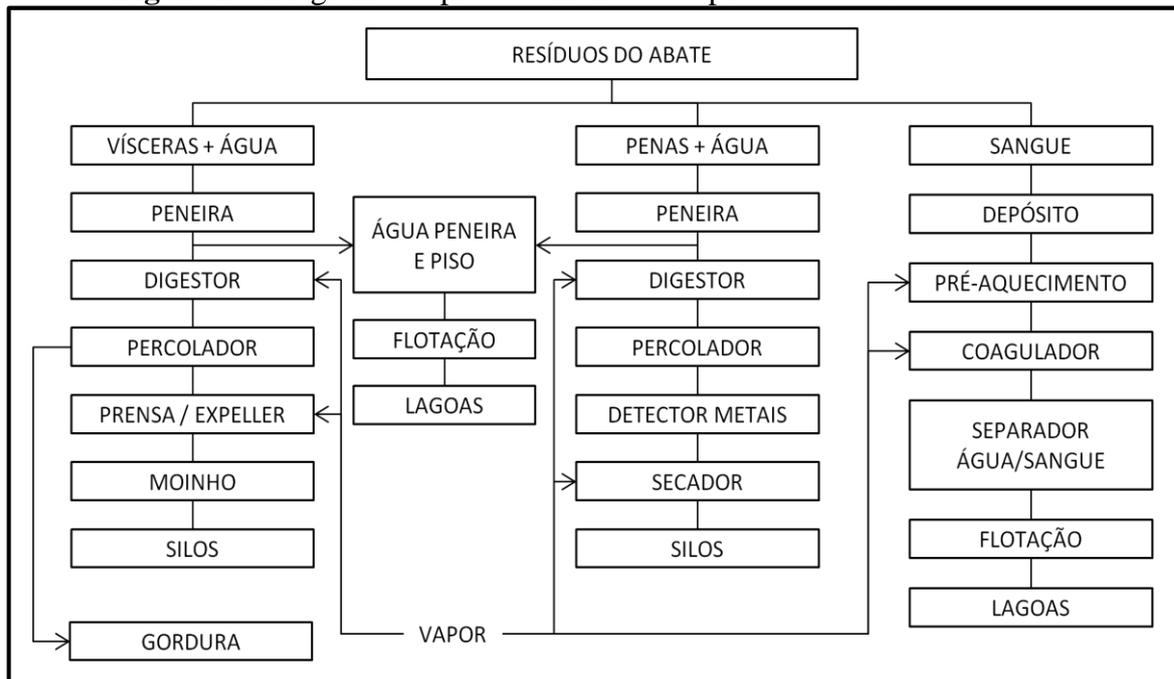
Costa, Romanelli e Trabuco (2008) apontam a farinha de subprodutos como um ingrediente nutricional primordial na elaboração de rações para animais domésticos, porém a falta de uniformidade da matéria-prima ocasiona produtos com variações de composição, sendo que os produtos de origem animal são ingredientes que merecem avaliação detalhada de sua composição química e microbiológica para que sejam utilizados com sucesso.

Rostagno et al. (2011) demonstra em seu estudo que a farinha de vísceras é composta proximalmente a 57,68% de teor proteico, 14,17% de gordura, 15,19% de matéria mineral e 7% de umidade. O mesmo autor descreve como aminoácidos presentes em farinhas de vísceras a lisina, metionina, treonina, triptofano, arginina, valina, isoleucina, leucina, histidina e fenilalanina. Piva et al (2001) afirmam que as farinhas tem sido amplamente utilizadas na alimentação animal visto o seu conteúdo de aminoácidos essenciais disponíveis, sais minerais e vitamina B12, essenciais para alimentação de monogástricos.

3.1.3 Processamento da Farinha de Vísceras

Silva (2009) expõe que, em processos convencionais, as vísceras não comestíveis, cabeças e pés, são conduzidos por canaletas ou por gravidade até um depósito, passando em seguida por uma peneira rotativa, onde se faz a separação das fases sólida e líquida. O líquido segue por uma tubulação até o lavador de gases, enquanto a parte sólida é levada a um silo de estocagem. No digestor, processa-se o cozimento do subproduto já separado, onde é submetido à esterilização em autoclave, em tempo e temperatura variáveis entre 106 e 121 °C, geralmente sob uma pressão de cerca de 5,5 kgf/cm². A Figura 2 representa o diagrama produtivo de processo convencional de farinhas de vísceras adaptado.

Ao final do processo, ocorre a separação grosseira do conteúdo sólido de interesse do sobrenadante (mistura de água e gordura). O sobrenadante, água+gordura, é separado por meio de funil, descartando-se a água. Após a decantação da gordura, a borra que se acumula no fundo é reenviada para ser reprocessada no digestor. A gordura, então, é armazenada e, posteriormente, transportada à fábrica de ração. A parte sólida é resfriada à temperatura ambiente e, ao final, é moída em moinho dotado de peneiras de 6 mm (SABINO e FINZER, 2006).

Figura 2 – Diagrama do processamento de coprodutos do abate de aves.

Fonte: adaptado de Olivo (2006)

Também afirmam que as instalações destinadas para o processamento devem possuir prédio em separado, contendo equipamentos específicos para este processo. Consideram de vital importância que as boas práticas de fabricação, como procedimentos sanitários e operacionais, sejam executados durante todo o fluxo produtivo, desde a obtenção dos subprodutos no abatedouro, até o envase final da farinha para sua posterior venda, sem se despreocupar com o rendimento do processo, tornando-o lucrativo.

A padronização dos subprodutos depende do processo produtivo e da origem dos subprodutos que compõem as farinhas de origem animal. Portanto, a determinação do fluxo dos subprodutos do abatedouro faz-se necessária durante a execução do projeto de implantação da fábrica para processamento desses coprodutos. Além disso, o projeto deve contemplar situações operacionais que permitam a diversificação de produtos devido às oscilações de inclusões dos descartes do abatedouro, mediante o comportamento do mercado de carnes (OLIVO, 2006).

Silva (2009) aponta que alguns produtores utilizam antioxidantes como preservativos de oxidação nas farinhas e, além disso, efetuam ainda secagens em estufas com ar circulante para diminuir o teor de umidade do produto. Awonorin et al (1995) descreve que a qualidade nutricional da farinha produzida depende de fatores como: a) a composição e o tipo das matérias-primas aplicadas ao processo; e b) as condições térmicas do processo utilizadas (tipo de processo e a combinação tempo x temperatura). Para farinhas de carne, a

composição química e as perdas para umidade e nutrientes são significativamente afetadas pelas condições de transferência de calor aplicadas.

Face aos dados apresentados, o desenvolvimento de novas tecnologias vem de encontro à necessidade de um melhoramento na extração destas proteínas disponíveis nos subprodutos da indústria de frango.

3.2 Proteínas

As proteínas são macromoléculas complexas, constituídas por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, formadas por aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas (ORDOÑEZ, 2005a). São componentes que podem desempenhar diferentes funções biológicas, as quais não poderiam ser efetivas não fosse a complexidade de sua composição, o que dá origem a diversas formas estruturais tridimensionais, cada uma com uma função biológica. O nome proteína tem origem da palavra grega *proteois*, que significa o primeiro tipo (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

As propriedades e a funcionalidade das proteínas dependem de sua composição aminoacídica e da disposição das ligações que estabilizam a sua estrutura. Em face de função que as proteínas podem desempenhar, podemos classificá-las estas em três grandes categorias: proteínas estruturais, proteínas com atividade biológica e proteínas com valor nutritivo, sendo que uma proteína pode não pertencer apenas a uma categoria, podendo ser uma proteína estrutural ou biologicamente ativa e ainda, sim, possuir valor nutritivo (ORDOÑEZ, 2005a).

Sob o ponto de vista nutricional, os componentes nitrogenados são os mais importantes, sendo que aproximadamente 95% do conteúdo de nitrogênio do músculo é devido às proteínas e o restante 5% dá-se devido a pequenos peptídeos, aminoácidos livres e outros componentes (ureia, guanidina, creatina, glutatona), estes últimos constituindo fonte de nitrogênio para novos aminoácidos e sínteses proteicas (GOMIDE, RAMOS e FONTES, 2013).

O músculo esquelético representa aproximadamente 50% do peso da carcaça de bovinos, ovinos e suínos, representando até 75% do peso vivo destes animais. Avaliando tais dados, podemos afirmar que o tecido muscular é um componente importante do corpo dos animais e o principal da fração comestível (ORDOÑEZ, 2005b). As proteínas constituem o elemento estrutural dos organismos animais, sendo que a carne de mamíferos contém 60-80% de água e 15-25% de proteína, sendo o restante formado principalmente por gorduras, carboidratos, sais, pigmentos e vitaminas (BOBBIO e BOBBIO, 2003).

Segundo Tornberg (2005), as proteínas contidas no músculo podem ser distribuídas em três grandes grupos, de acordo com a solubilidade:

- Proteínas miofibrilares: são extraídas com soluções salinas e são divididas em três subclasses:
 - Proteínas fibrosas miofilamentosas: são estas a actina e a miosina, constituindo a estrutura miofibrilar do músculo.
 - Proteínas regulatórias: incluem a tropomiosina, o complexo troponina.
 - Proteínas estruturais: incluem a titina, a nebulina, a desmina e atuam suportando toda a estrutura miofibrilar. Titina é uma proteína com peso molecular aproximadamente de 1 milhão de Dalton.
- Proteínas sarcoplasmáticas: são solúveis, extraídas com água ou soluções salinas diluídas; constituem a maioria das enzimas da rota glicolítica e mioglobina. Mais de 100 diferentes proteínas são conhecidas, presentes na fração sarcoplasmática e a maioria de forma globular, com peso molecular entre 17000 (mioglobina) e 92500 Dalton (Fosforilase b).
- Proteínas do tecido conectivo: são insolúveis em água e solúveis em soluções ácidas ou básicas. Constituem este grupo o colágeno, a reticulina, a elastina e todas proteínas fibrosas, sendo a glicoproteína colágeno a maior componente deste grupo e com peso molecular de 300000 Dalton.

Em 100 g de proteínas musculares, há aproximadamente 50 a 55 g de proteínas miofibrilares, 30 a 35 g de proteínas sarcoplasmáticas e 10 a 15 g de proteínas do tecido conectivo (NIU et al, 2015).

3.2.1 Solubilidade das proteínas

As proteínas possuem algumas propriedades que as tornam específicas para processamento e armazenamento das mesmas. Estas são definidas como propriedades não nutricionais as quais são capazes de influenciar nas características sensoriais, físicas e químicas dos alimentos. Estas propriedades funcionais são divididas em propriedades hidrodinâmicas e de superfície (ORDOÑEZ, 2005a).

A solubilidade de uma proteína é uma manifestação termodinâmica do equilíbrio entre interações proteína-proteína e proteína-solvente. As principais interações que influenciam as características de solubilidade das proteínas são de natureza hidrofóbica e iônica. As interações hidrofóbicas promovem as interações proteína-proteína, resultando em redução da solubilidade, enquanto as iônicas promovem interações proteína-água e resultam em aumento de solubilidade (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Ordoñez (2005a) descreve que a solubilidade em pH neutro ou no ponto isoelétrico costuma ser a primeira propriedade funcional a ser mensurada de um ingrediente

proteico, visto que proteínas insolúveis têm pouca aplicabilidade na indústria alimentícia, assim como é interessante conhecer a solubilidade quando se pretende trabalhar com extração e purificação de proteínas. O mesmo autor classifica as proteínas em quatro grupos conforme o grau de solubilidade: albuminas, solúveis em água a um pH de 6,6; globulinas, solúveis em soluções salinas diluídas a pH 7; prolaminas, solúveis em etanol a 70%; e gluteninas, solúveis unicamente em soluções muito ácidas ou muito alcalinas.

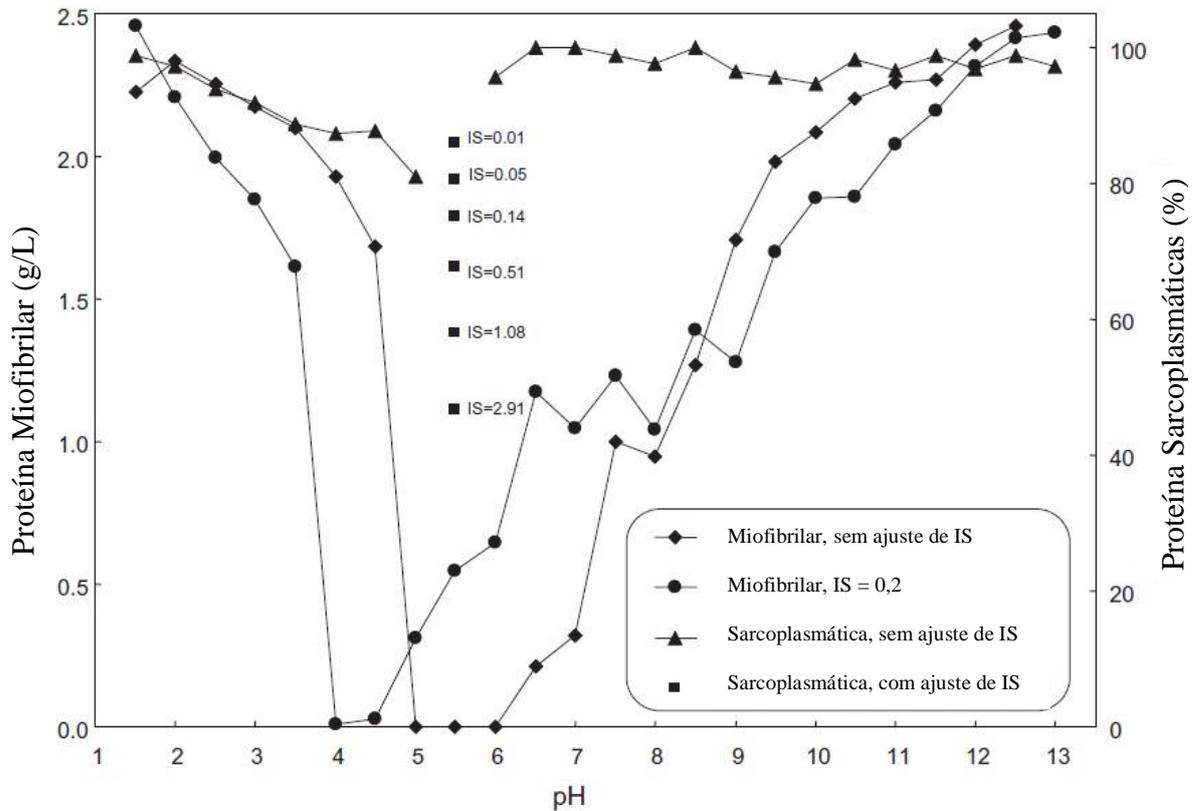
Bigelow (1967) propõe que a solubilidade de uma proteína está fundamentalmente relacionada à hidrofobicidade média dos resíduos de aminoácidos e à frequência da carga. De acordo com este autor, quanto menor a hidrofobicidade média e maior a frequência de carga, maior será a solubilidade da proteína. Além das propriedades físico-químicas intrínsecas, a solubilidade é influenciada por várias condições da solução, como pH (ponto isoelétrico), força iônica, temperatura e presença de solventes orgânicos.

As proteínas são, em geral, mais solúveis em pH baixos (ácidos) e elevados (alcalinos), por conta da carga em seu grupo carboxílico (ácido) ou amino (básico). A solubilidade depende grandemente do número e do arranjo de cargas na molécula; estas por sua vez dependem da composição de aminoácidos, particularmente do número de resíduos ácidos (aspartil e glutamil) e básicos (histidil, arginil e lisil). Outras macromoléculas também podem influenciar na solubilidade, como lipídios e carboidratos, além de sais como fosfatos (SGARBIERI, 1996).

Gehring et al (2011) descrevem que as cadeias laterais podem assumir diferentes cargas eletrostáticas, dependendo das condições a que as proteínas musculares são submetidas, como é demonstrado na Figura 3. Isto significa que a solubilidade das proteínas musculares pode ser “ligada” ou “desligada” com o fornecimento de condições que favoreçam ou desfavoreçam a solubilidade da proteína conseqüentemente. Quando um ácido é adicionado a uma solução proteica, ele dissocia-se dando origem a íons hidrônio (H_3O^+). A protonação das cadeias carregadas negativamente nos resíduos glutamil ou aspartil resulta num aumento de carga de superfície positiva. Do mesmo modo, quando uma base (OH^-) é adicionada, a desprotonação das cadeias laterais contendo resíduos de tirosil, triptofanil, cistenil, lisil, arginil ou histidil contribui para um aumento na carga de superfície negativa.

Se o grau de associação das entidades proteicas é muito grande, levando a uma menor estabilidade coloidal do sistema, a solubilidade das proteínas então é diminuída e estas são precipitadas. Se, no entanto, a associação tridimensional das proteínas ocorre de tal maneira que as forças de atração e de repulsão são equilibradas, é formada uma rede tridimensional e, conseqüentemente, um gel (TORNBERG, 2005).

Figura 3 – Curva de solubilização de proteínas musculares de peixe (miofibrilares e sarcoplasmáticas) afetadas pelo pH e força iônica (IS)



Fonte: Gehring et al, 2011.

Possivelmente as transformações físico-químicas das proteínas sejam as alterações mais importantes nos alimentos. Assim, por exemplo, a desnaturação, ainda que não afete a digestibilidade das proteínas, pode resultar em alterações da solubilidade, da retenção de água, da capacidade de participar de emulsões e pode também produzir um aumento da reatividade química da proteína por exposição de mais grupos reativos da cadeia proteica (como $-SH$), que estão protegidos na proteína natural pelas estruturas quaternárias, terciárias e secundárias da molécula e que são alteradas pela desnaturação (BOBBIO e BOBBIO, 2003).

3.2.2 pH das proteínas

O ponto isoelétrico (PI) é o valor de pH, onde as cargas positivas e negativas se equivalem, ou seja, quando as moléculas não possuem cargas positivas nem negativas em excesso. Nesse pH a proteína não migra para nenhum polo quando colocada em campo elétrico. O pH isoelétrico depende dos pks dos grupos ionizáveis e será mais alto quanto mais resíduos básicos houver e mais baixo quanto mais resíduos ácidos estiverem presentes. A maioria das proteínas apresenta ponto isoelétrico na faixa de 3,5 a 6,5 (SGARBIERI, 1996).

Os íons H^+ e OH^- da água provocam efeitos parecidos, no entanto, além de afetarem a envoltura das proteínas também afetam a carga elétrica dos grupos ácidos e básicos das cadeias laterais dos aminoácidos. Esta alteração na carga superficial das proteínas elimina

as interações eletrostáticas que estabilizam a estrutura terciária e provocam sua precipitação. A solubilidade de uma proteína é mínima no ponto isoelétrico, já que sua carga é zero e desaparece qualquer força de repulsão eletrostática que poderia dificultar a formação de precipitados (PARDI et al., 2001).

O PI de proteínas musculares é um parâmetro importante, porque, como as cargas sobre a superfície da proteína diminuem como também as interações proteína-água e, portanto, a solubilidade em água das proteínas e conseqüentemente diminui sua capacidade de retenção de água. Além disso, as proteínas formam géis pobres em seu PI. No entanto, a hidrofobicidade das interações proteína-proteína é favorecida no PI, alcançando a solubilidade mínima e conseqüentemente precipitando. Esta mediação de pH, conhecendo-se o comportamento do PI das proteínas, permite a modificação da solubilidade e a precipitação das proteínas pelo ajuste de pH do meio. As curvas de solubilidade proteica (ou perfis) em função do pH são muitas vezes construídas experimentalmente a fim de determinar os melhores pontos de solubilidade proteica e precipitação (PI). Este comportamento isoelétrico das proteínas musculares permite que sejam recuperadas proteínas do meio, efetuando-se apenas a variação e ajuste de pH do meio, recuperando as mesmas por processo físico de separação (GEHRING et al, 2011).

3.2.3 Força iônica

A cristalização proteica depende basicamente de dois fatores: solubilidade e nucleação, e processo de crescimento dos cristais. Estas características podem ser afetadas com adição de substâncias às soluções proteicas. É evidente que a adição de solventes (sais, neste caso) altera a solubilidade do complexo de proteínas (TIMASHEFF e ARAKAWA, 1988). Os mesmos autores apontam que, em baixas concentrações do aditivo (<1,0 M), a solubilização das proteínas é aumentada, característica denominada zona de *salting-in*. Já em concentrações altas do aditivo, a solubilidade diminui, tornando as proteínas insolúveis em água, característica denominada de efeito *salting-out*.

Villamonte et al. (2013) descreve que polifosfatos são normalmente utilizados em produtos a base de carne em associação ao cloreto de sódio para aumentar as propriedades de ligação e solubilização das proteínas miofibrilares. Já Moller et al. (2012) citam que o uso de sais (ex.: cloreto de sódio - NaCl, sulfato de sódio - Na₂SO₄) como agentes de precipitação é, em grande parte, devido aos efeitos de blindagem eletrostática, o que diminui a interação eletrostática repulsiva efetiva das proteínas carregadas.

Visak et al. (2007) concluem que a adição de sais a uma solução proteica acarreta a formação de um sistema bifásico, ocasionando o efeito de *salting-out* e, por conseqüente,

precipitando as proteínas da solução. Já Chang e Bae (2003) propuseram uma equação de estado para a precipitação proteica induzida por sais, apontando que a estrutura da proteína é considerada significativa para efeitos de desnaturação. Meurer, Sandler e Lenhoff (2011) concluem que foi observado um efeito de *salting-in* em soluções de quimosina a uma faixa de pH de 4,0-5,0, com resultados similares para β -lactoglobulina B e globulina de semente de abóboras. A concentração de cloreto de sódio (NaCl) utilizada apresentou valores entre 0,3 a 0,6 M.

3.3 Processo de isolamento das proteínas

O isolamento de proteína é basicamente um processo de extração e purificação, o qual visa obter um produto livre de interferentes e, portanto, mais concentrado, o qual, por isso, tem outras propriedades e características de conservação e uso (MARTINS et al., 2011). Os isolados proteicos são obtidos de diversos alimentos, tais como soja, feijão, leite, frango, pescados e outros.

Novas tecnologias devem continuamente ser desenvolvidas para o aproveitamento de alimentos não convencionais, a fim de torná-los atrativos sob o ponto de vista funcional, nutricional e econômico. Mamaghani (2010) cita um breve histórico de estudos de separação proteica. Na década de 1970, estudou-se a separação de proteínas por centrifugação para separar as proteínas miofibrilares de pigmentos e lipídios. Também cita o estudo de extração aquosa a um pH 7 seguida por uma precipitação a pH 4,5 em carne mecanicamente separada de frango (CMSF). Já na década de 1980, estudos utilizaram tampão fosfato a um pH de 8 para extração proteica com eficiência na remoção de pigmentos e lipídios em carne mecanicamente separada de peru (CMSP).

Outra forma convencional de concentração de proteínas é o surimi, que consiste em lavagens sucessivas com soluções aquosas levemente alcalinas, nas quais alguns compostos solúveis em água são diluídos e a gordura neutra removida. Após este processo, são adicionados crioprotetores para posterior congelamento. Infelizmente, a estabilidade na armazenagem é o principal problema no produto surimi e, também, a perda das proteínas sarcoplasmáticas no processo reduzem o rendimento de obtenção de surimi em relação à matéria-prima utilizada (NOLSOE e UNDELAND, 2009).

Cortez-Vega et al. (2013) comentam que o processamento, utilizando a variação de pH como tecnologia inovadora, a qual inclui uma solubilização alcalina/ácida como ferramenta para isolamento de proteínas de uma matriz alimentícia, elimina materiais indesejáveis como lipídios e outros contaminantes durante o processo. Também citam que a

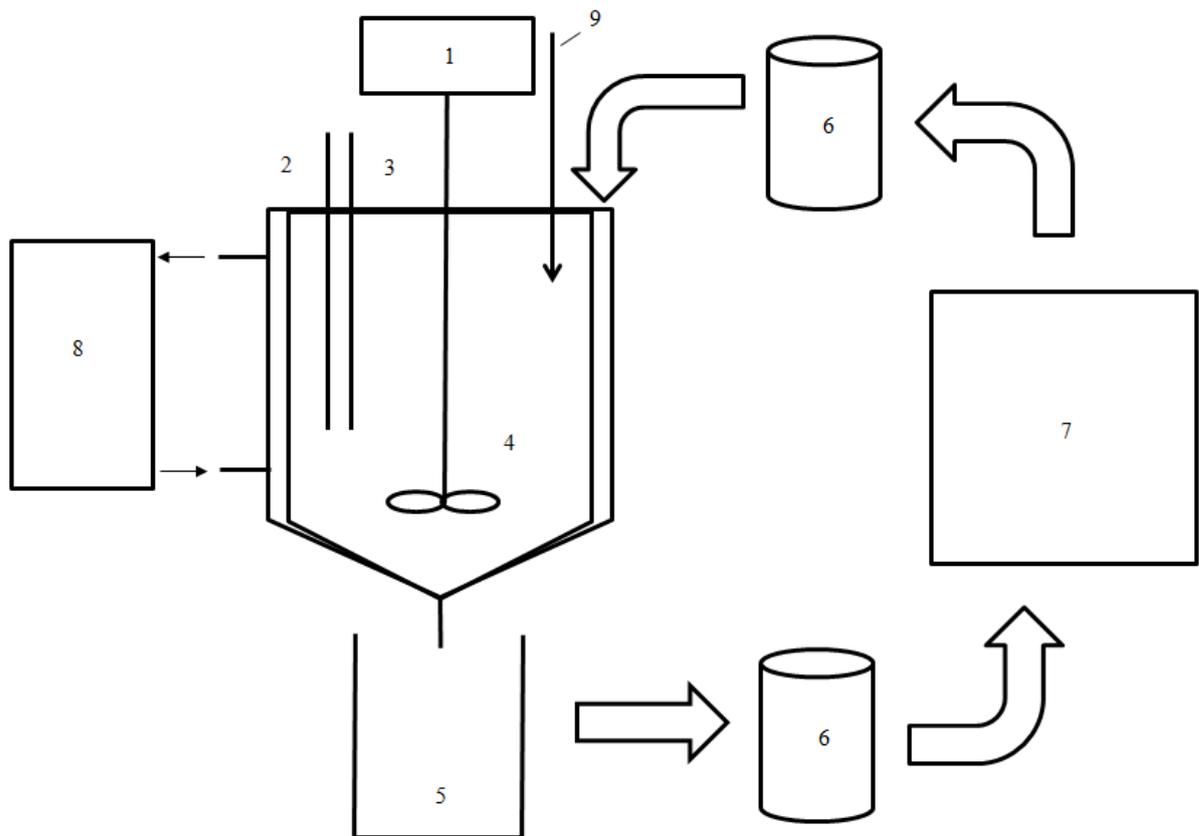
proteína geralmente apresenta propriedades funcionais e nutricionais ótimas, podendo ser utilizada em produtos de valor agregado.

Como as proteínas assumem uma carga líquida mais positiva ou negativa, elas gradualmente iniciam as interações eletrostáticas com a água (isto é, interações proteína-água). Devido ao aumento das interações proteína-água, a hidrofobicidade proteína-proteína tendem a diminuir. Portanto, como as moléculas proteicas tornam-se polares (carregadas), uma maior quantidade de água é necessária na superfície proteica, tornando as mesmas solúveis em água. No entanto é possível ajustar uma solução proteica de modo que as cargas negativas da superfície de uma proteína sejam iguais às cargas positivas e, por conseguinte, a molécula de proteína assume uma carga eletrostática líquida igual a zero, precipitando-se, esta característica fundamental do processo de variação de pH (GEHRING et al, 2011).

Não existe um método único ou um conjunto de métodos aplicáveis ao isolamento de todas as proteínas indistintamente; porém, para qualquer proteína, é possível, geralmente, escolher-se uma sequência de etapas de separação que irá resultar em um grau elevado de purificação e um alto rendimento. O objetivo geral é aumentar a pureza ou a afinidade biológica da proteína desejada por unidade de peso, pela eliminação das proteínas inativas ou indesejáveis, enquanto, ao mesmo tempo, eleva-se o rendimento ao máximo (LEHNINGER, 1976).

O processo de solubilização ácida ou alcalina das proteínas ou processo de variação de pH (ou pH *shifting process*) foi desenvolvido na Estação Marinha, da Universidade de Massachusetts, nos Estados Unidos, utilizando o princípio de que a solubilidade de um material proteico homogeneizado em água é afetada pelo pH da mistura. Nas condições extremas ácidas ou alcalinas ocorrem fortes variações positivas e negativas, respectivamente sobre as proteínas miofibrilares e o citoesqueleto conduz à repulsão, e a interação com a água ocorrendo à solubilização (NOLSØE e UNDELAND, 2009). A Figura 4 apresenta um esquema de equipamentos do processo de variação do pH.

Figura 4 – Esquema do processo e equipamentos do processo de variação do pH.



Onde: 1 = Agitador eixo-hélice; 2 = medidor de pH; 3 = termômetro; 4 = reator com jaqueta; 5 = coletor da mistura; 6 = tubo de centrifuga; 7 = centrífuga de piso refrigerada; 8 = banho ultratermostático circulador (fluido refrigerante do reator); 9 = adição de reagente ácido/alcalino.

Fonte: o autor.

O processo de variação de pH é um método de solubilização seletiva induzida por pH. Neste processo, as proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares são primeiramente solubilizadas tanto em meios de pH ácido quanto alcalino e então separados dos lipídios e materiais insolúveis (ex: ossos, peles, tecidos conjuntivos). As proteínas solubilizadas então são precipitadas em seu pH de PI (KHIARI et al, 2014). O processo de variação do pH recupera proteínas funcionais e nutricionais com grandes rendimentos (HULTIN e KELLEHER, 1999).

Até o momento, isolados de proteína funcionais foram recuperados com sucesso a partir de: pescados (BROWN et al, 2012; TAHERGORABI et al, 2012; MARMON e UNDELAND, 2013); bovinos (DE WITT, GOMEZ e JAMES, 2002); frangos (OMANA et al, 2010; TAHERGORABI, SIVANANDAN e JACZYNSKI, 2012; WANG, WU e BETTI, 2013; KHIARI et al, 2014); e peru (HRYNETS et al, 2011). A experiência do Laboratório de Tecnologia de Alimentos teve sucesso no isolamento de proteínas pelo processo de variação do pH em pescados (MARTINS et al, 2011; FREITAS et al, 2011a; Ferreira et al, 2013;

CORTEZ-VEGA et al, 2013) e frangos (MORAES, 2009; MORAES et al, 2011; MENEZES, 2014).

Um dos mais importantes benefícios da metodologia de variação do pH é que os materiais indesejáveis, como peles, ossos, micro-organismos, colesterol, lipídios de membrana, tecidos conectivos e outros contaminantes são removidos durante a primeira fase de centrifugação, embora os ossos possam ser removidos também anteriormente ao processo por desossa mecânica (KRISTINSSON et al, 2005).

Muitos fatores interferem na capacidade de extração proteica, como a qualidade da matéria-prima, relação sólido/líquido, pH, temperatura, velocidade de centrifugação e força iônica. Contudo a máxima recuperação durante o processo de extração é de vital importância para determinar a quantidade de proteína no concentrado ou isolado (KAIN et al, 2009).

A obtenção de princípios ativos presentes nos resíduos da industrialização de alimentos é uma alternativa, pois a redução destes resíduos minimizaria problemas de poluição ambiental e também apresentaria uma forma de agregar valor aos resíduos através da extração destes princípios ativos presentes (MORAES, 2009).

Costa (2003) afirma que resíduos de origem animal podem ser utilizados para alimentação humana, principalmente em países onde parte da população é subnutrida. A recuperação e modificação dos resíduos das indústrias de alimentos assumem grande importância, uma vez que permitem não só diminuir o custo de insumos principais e minimizar os problemas de poluição ambiental como também criar novas fontes alternativas de alimentos de alto valor nutricional com características sensoriais adequadas e a um preço acessível. A transformação de um material descartável em um subproduto e finalmente num produto requer um longo processo, baseado em tecnologia, conhecimento, necessidade, fatores econômicos e legislação.

O mesmo autor também afirma que os usos dos concentrados de proteínas são diversos. A proteína de qualidade elevada é um ingrediente para formulações da dieta de alimentos para bebês. Os concentrados de proteína são usados também para fornecer o contrapeso nutritivo a uma variedade de formulações de rações para animais de estimação e também para aquicultura.

Os concentrados e isolados proteicos têm sido produzidos em grande escala para servir como ingredientes funcionais em uma ampla e sempre crescente faixa de aplicação em alimentos. Quando substituem proteínas convencionais, os concentrados e isolados desenvolvidos poderão manter ou melhorar a qualidade e aceitabilidade dos produtos aos quais foram incorporados (HUA et al, 2005).

3.4 Propriedades funcionais e nutricionais

Chamam-se propriedades funcionais quaisquer funções que uma classe de compostos possa desempenhar numa determinada aplicação tecnológica. As preferências alimentares dos seres humanos estão baseadas em atributos sensoriais, que são caracterizados pelo efeito líquido de interações complexas entre vários componentes de menor ou maior quantidade no alimento. As proteínas em geral tem uma grande influência sobre atributos sensoriais (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Para ter utilidade e sucesso na aplicação de alimentos, a adição de proteínas para prover aminoácidos essenciais deve idealmente possuir várias características desejáveis referentes às propriedades funcionais, tais como solubilidade sob diferentes condições, emulsificação, capacidade de formação de espuma, capacidade de retenção de água, flavor ligante de sabor, texturabilidade e etc. (SCHMIDT, 2008).

As propriedades funcionais dependem das características físico-químicas intrínsecas da proteína, como sequência e composição de aminoácidos, peso molecular, conformação e carga distribuída sobre a molécula. A natureza e densidade de carga facilitam interações com outros componentes alimentares, tais como água, íons, lipídios, carboidratos, vitaminas, constituintes de cor e do flavor, dependendo do envolvimento (pH, temperatura, força iônica) durante a preparação, processo e estocagem (BELITZ e GROSCH, 1997).

O conhecimento das propriedades funcionais específicas de isolados proteicos facilita sua aplicação adequada, contribuindo para o melhor uso da tecnologia de isolamento. Uma boa solubilidade proteica é necessária para muitas aplicações, especialmente para emulsões, espumas e géis. A capacidade de retenção de óleo é de grande importância na formulação de alimentos, sendo capaz de influenciar a ordem de adição de ingredientes secos na mistura, além de ser utilizada para determinar os tempos de mistura usando uma distribuição uniforme do óleo ou de gorduras nas misturas secas (FERREIRA et al, 2013).

A qualidade nutritiva de qualquer proteína alimentar é determinada pelos seguintes fatores: conteúdo dos aminoácidos essenciais e não essenciais; proporções específicas de aminoácidos essenciais que, preferencialmente, devem ser semelhantes aos encontrados nas proteínas do corpo humano; energia fornecida, o que é essencial para a síntese de proteínas no corpo; além da sua digestibilidade (HRYNIEWIECKI, 2000 citado por USYDUS, SZLINDER-RICHER e ADAMCZYK, 2009).

3.4.1 Solubilidade

A solubilidade das proteínas é relativamente elevada em água e reduzida em solventes orgânicos. De acordo com a solubilidade em vários solventes, as proteínas podem

ser classificadas em albuminas, globulinas, prolaminas, gluteninas, escleroproteínas, histonas e protaminas (SGARBIERI, 1996).

A solubilidade é responsável por um número de propriedades funcionais que afetam a aceitação de produtos alimentícios pelos consumidores e, conseqüentemente, a solubilidade desempenha um papel fundamental no processamento de alimentos e desenvolvimento de produtos. Em muitos casos, os isolados proteicos podem ser produzidos por extração alcalina/ácida e precipitação proteica, melhorando significativamente o rendimento da proteína em suas propriedades funcionais (WANG et al, 2015).

Uma boa solubilidade das proteínas é necessária para muitas aplicações, especialmente para emulsões, espumas e géis. Proteínas solúveis fornecem uma dispersão homogênea das moléculas em sistemas coloidais e melhoram as propriedades interfaciais. A solubilidade é uma das mais importantes propriedades funcionais de hidrolisados de proteínas (THIANSILAKUL; BENJAKUL e SHAHIDI, 2007).

3.4.2 Capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade de retenção de água é uma propriedade funcional que envolve a interação entre a proteína ou o alimento proteico e a água. Esta maior ou menor afinidade da proteína com a água está relacionada com propriedades funcionais como textura, viscosidade, geleificação e emulsificação. A CRA é a quantidade de água que permanece no alimento proteico após a exposição a um excesso de água e a aplicação de uma força centrífuga ou pressão (SGARBIERI, 1996).

3.4.3 Capacidade de retenção de óleo (CRO)

A absorção de gordura é uma propriedade funcional muito considerada, onde a proteína é misturada com uma quantidade específica de excesso de gordura por um determinado tempo e, em seguida, centrifugada, sendo a quantidade de gordura absorvida, expressa em mililitros de gordura ligada por grama de proteína. Tem grande importância na formulação de alimentos, podendo influenciar na ordem de adição dos ingredientes secos na mistura, contribuindo para uma distribuição uniforme (FONTANA, 2007).

3.4.4 Digestibilidade das proteínas

A digestibilidade da proteína deve ser entendida como sendo a parte ou porção da proteína que pode ser hidrolisada pelas enzimas digestivas até aminoácidos e que, portanto, estaria disponível biologicamente, desde que não houvesse nenhuma interferência na absorção dos aminoácidos pelo organismo humano. *In vitro*, a digestibilidade de uma proteína é estimada usando-se enzimas proteolíticas que agem normalmente na digestão, procurando-se imitar, inclusive, as condições de acidez ou de pH, características do estômago e do intestino,

onde a digestão das proteínas se processa, sendo um fator importante na determinação do valor nutritivo de uma proteína. Esta é avaliada pelo quociente do nitrogênio absorvido pelo nitrogênio ingerido com a dieta, expresso em porcentagem (SGARBIERI, 1996).

A digestibilidade da proteína é determinada em função da fração do nitrogênio ingerido que o animal absorve. A digestibilidade verdadeira é obtida pela diferença entre o nitrogênio ingerido e aquele que aparece nas fezes, corrigido pela quantidade de nitrogênio fecal excretado, quando o indivíduo consome uma dieta livre de proteína (PIRES et al, 2006). Em face disto, a digestibilidade proteica torna-se importante quando se busca reduzir os custos de produção, inclusive quando alimentos não convencionais são usados em formulações de rações para animais.

Segundo REED (1984) uma proteína de alta qualidade, no caso de proteína para dieta, significa excelente suporte de síntese protéica. Uma proteína dietética de alta qualidade maximiza o pool de aminoácidos para prover toda a quantidade de todos os aminoácidos essenciais. Inerente a tal definição há duas condições: (1) uma proteína precisa conter quantidade adequada de aminoácidos essenciais, e (2) uma proteína precisa ter boa digestibilidade.

Nunes, Sá e Browdy (2014) apontam que, em um cenário real, os ingredientes disponíveis comercialmente têm quantidades significativas de fatores antinutricionais, tornando variável a digestibilidade das proteínas. Nas produções de rações podem ocorrer grandes perdas nutricionais nos processamentos e armazenamentos das farinhas produzidas. Os mesmos autores apontam que qualquer excesso em determinado aminoácido ingerido pelo animal será catabolizado em energia, porém uma dieta ineficiente em um ou mais aminoácidos poderá conter a síntese de proteínas e comprometer o crescimento dos animais.

3.5.4.1 Perfil de aminoácidos

Embora o conteúdo dos aminoácidos essenciais seja o indicador primário da qualidade proteica, a verdadeira qualidade também depende do nível de utilização desses aminoácidos no organismo. Dessa forma, a digestibilidade (biodisponibilidade) de aminoácidos pode afetar a qualidade das proteínas. As proteínas alimentares de animais são mais bem digeridas do que as de origem vegetal (DAMODARAM, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Os níveis de proteína estabelecidos devem ser encarados apenas como indicações. De modo geral, nos níveis proteicos recomendados, as exigências de arginina, glicina+serina, valina, isoleucina, leucina, histidina e de fenilalanina+tirosina são normalmente satisfeitas. Segundo Rostagno et al (2011), os níveis de aminoácidos devem ser bem aproximados dos

recomendados, evitando-se excessos. De modo semelhante, excessos de proteínas também devem ser evitados. O mesmo autor em suas tabelas brasileiras para aves e suínos trás que a necessidade aminoacídica para aves é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Relação aminoácido/lisina utilizada para estimar exigências de aminoácidos de frangos de corte.

Aminoácido	Fases			
	1 – 21 dias		22 – 56 dias	
	Dig. (%)	Total	Dig. (%)	Total
Lisina	100	100	100	100
Metionina+Cistina	72	72	73	73
Treonina	65	68	65	68
Triptofano	17	17	18	18
Arginina	108	105	108	105
Glicina+Serina	147	150	134	137
Valina	77	79	78	80
Isoleucina	67	67	68	68
Leucina	107	107	108	108
Histidina	37	37	37	37
Fenilalanina+Tirosina	115	115	115	115

Fonte: Rostagno et al (2011).

Com relação à alimentação humana, FAO (1985) traz como requisito mínimo para adultos os dados da Tabela 4.

Tabela 4 – Padrão recomendado de aminoácidos essenciais para as proteínas alimentares.

Aminoácido	Padrão recomendado (mg AA/g de proteína)
Histidina	16
Isoleucina	13
Leucina	19
Lisina	16
Metionina + Cisteína	17
Fenilalanina + Tirosina	19
Treonina	9
Triptofano	5
Valina	13

Fonte: FAO (1985).

A qualidade nutricional de uma proteína é ideal quando contém todos os aminoácidos essenciais em proporções que produzam excelentes taxas de crescimento e/ou ótima capacidade de manutenção.

3.5 Aumento de escala

Mesmo que muitas vezes não é feita qualquer distinção entre invenção e inovação, as diferenças não são, definitivamente, sutis. Nem sempre é possível transformar uma boa ideia em uma inovação e colocá-lo em prática: uma invenção pode, por vezes, estar sem uso por anos sem ter seu retorno financeiro em termos de realização industrial e de negócio

rentável. A atividade de escalamento de processos representa a síntese do conhecimento acumulado em várias fases do processo de desenvolvimento em laboratórios, tornando as variáveis estudadas para os processos dominadas e possíveis de serem aumentadas em sua quantidade, transformando o processo em escala piloto (DONATI e PALUDETTO, 1997).

Em termos ambientais, um problema grave é como fazer previsões para uma dinâmica populacional grande com base na informação obtida em pequenas escalas, pois as tendências de pequena escala são normalmente contrariadas pelos resultados em aumento de escala. No nível mais fundamental, a teoria da transição de escala mostra que a maioria das mudanças importantes na dinâmica populacional quando da mudança de escala pode ser atribuída a uma interação entre a escala local da população não-linear e a variação espacial em qualquer densidade (MELBOURNE e CHESSON, 2005).

Esta variação é chamada de análise dimensional, definida por uma metodologia para produção de respostas sem dimensões e derivando relações funcionais entre o que caracterizam completamente o processo e seu produto final. Escalonar um processo demanda a expressão das variáveis e as respostas em uma dimensão e a tentativa de igualar estas se aumentando as escalas dimensionais (LEVIN, 2005).

A literatura de aumento de escala para proteínas purificadas pelo processo de variação do pH não expõe muita informação. Gehring et al (2011) define que através do conhecimento das proteínas e lipídios em seu comportamento isoelétrico no meio, permite o desenvolvimento da tecnologia de purificação das proteínas pela variação do pH em escala laboratorial, bem como permite um aumento de escala para um processamento eficiente de novos produtos. Chen e Jaczynski (2007) estudaram processo contínuo para purificação de proteínas pela variação do pH, incluindo em seu processo as centrifugações com uma taxa de vazão de 120 L/h.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima (MP)

As matérias-primas utilizadas para obtenção de isolado proteico de frango (IPF) foram cabeças de frango, subprodutos da extração de carne mecanicamente separada (CMS) de frango e cortes de carcaças condenadas na evisceração, sendo estes considerados subprodutos não comestíveis provenientes do processo de abate de frangos. A MP foi fornecida por um abatedouro de aves localizado no interior do Estado do Rio Grande do Sul, sendo retirada no local em caixas térmicas de poliestireno estando congelada a uma temperatura de -8 °C. Depois foi descongelada e dosada, conforme os percentuais obtidos junto à indústria apresentados na Tabela 5, de sua composição em relação ao peso vivo de frango.

Três amostras de farinhas de vísceras de frango (FA) comerciais foram adquiridas de empresas no Estado do Rio Grande do Sul, sendo uma das amostras proveniente do mesmo estabelecimento abatedouro de aves.

Tabela 5 – Composição em percentual da matéria-prima utilizada para produção de isolado protéico de aves.

Parte do subproduto	Composição Subproduto (%)
Cabeças	49,4
Cortes Condenados	32,1
Subproduto extração CMS	18,5

Fonte: Abatedouro de aves no interior do RS.

4.2 Infraestrutura

Para o desenvolvimento do trabalho foi utilizada como infraestrutura o Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) e o Laboratório de Processamento de Pescado (LPP), ambos dependências da Escola de Química e Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), na cidade de Rio Grande, no Estado do Rio Grande do Sul.

A determinação do perfil de aminoácidos (aminograma) foi realizado no Centro de Química de Proteínas (CQP) localizado na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, na cidade de Ribeirão Preto, no Estado de São Paulo.

4.3 Procedimento experimental

4.4.1 Organização do trabalho

O trabalho proposto está organizado em procedimentos unitários de avaliação, sendo as metodologias desenvolvidas na sequência deste mesmo tópico:

- 1) Caracterização das três amostras do produto comercial FA, quanto a sua composição proximal (umidade, proteína, lipídios e cinzas) e os índices de qualidade como acidez, peróxidos e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Uma das amostras foi então escolhida como comparativo quanto às características funcionais (solubilidade, capacidade de retenção de água, capacidade de retenção de óleo) e nutricionais (digestibilidade e perfil de aminoácidos) da proteína existente no produto FA.
- 2) Composição da MP a ser utilizada na produção de IPF, quanto ao seu percentual em relação ao peso de frango vivo, determinada através dos valores médios obtidos juntamente à indústria abatedouro de frango parceira deste trabalho, durante o período de uma semana de processamento da mesma.
- 3) Caracterização da MP quanto à composição proximal (umidade, proteína, lipídios e cinzas) e os índices de acidez, de peróxido e TBARS.
- 4) Elaboração da curva de solubilização das proteínas da MP para diferentes condições de pH, a qual apresenta os dados do ponto de solubilização ácida/alcalina (PS) e determinará o melhor ponto isoelétrico (PI) para o processo de precipitação da proteína.
- 5) Produção de IPF em bancada avaliando sua composição proximal (umidade, proteína, lipídios e cinzas), rendimento do processo em massa e proteína e dos índices de qualidade como índice de acidez, peróxidos e TBARS, e também a qualificação quanto às mesmas características funcionais e nutricionais efetuadas na caracterização da FA.
- 6) Avaliação da possível influência da força iônica nos processos de solubilização das proteínas e de precipitação das proteínas em seu PI, considerando como respostas o rendimento em massa e composição proximal (umidade, proteína, lipídios e cinzas) do IPF obtido.
- 7) Desenvolvido de um planejamento de experimentos com duas variáveis (2^2) na etapa de solubilização proteica, sendo estudada a velocidade e o tempo de centrifugação, utilizando como resposta os teores de proteína e lipídios, além do rendimento proteico e da construção de superfícies de resposta para a interação das variáveis.
- 8) Aumento de escala do processo para produção de IPF. Do produto obtido, foi caracterizada a sua composição proximal (umidade, proteína, lipídios e cinzas) e os índices de qualidade (índice de peróxidos, índice de acidez e TBARS) além da

digestibilidade do isolado obtido, comparando-os com os resultados obtidos em escala laboratorial.

4.4.2 Equipamentos

Freezer horizontal marca Consul modelo 530, freezer vertical marca Bosch modelo 32, centrífuga de piso refrigerada de copos marca Hanil modelo Supra 22K, controlador Bio-Tec-Flex marca Tecnal (pHmetro) com eletrodo Mettler Toledo Inpro 3253I/SG/225, banho térmico marca Quimis, forno mufla microprocessado marca Quimis modelo Q318M24, estufa marca DeLeo modelo A1SE, balança semianalítica marca Marte, pHmetro de bancada marca Quimis modelo Q400AS, banho ultratermostático circulador Solotest marca Quimis modelo Q214M2, extrator de lipídios marca Quimis modelo Q30826B, incubadora refrigerada shaker de bancada marca Cientec modelo CT712RNT, destilador de nitrogênio marca Tecnal modelo O3611, digestor de proteínas marca Gerhard composto de Variostat, Turbosog e Kjeldatherm, centrífuga de bancada de tubos marca Biosystem modelo MPW350, banho térmico termoestatizado marca Brookfield modelo TC102, agitador eixo-hélice marca Fisatom modelo 713D, agitador eixo-hélice marca IKA Labortechnik modelo RW20DZM, refrigerador marca Refrimate, desossadora mecânica marca High Tech modelo HT250C, liquidificador tipo blender marca Brastemp modelo BUA05AZAIM, liquidificador tipo blender marca Metvisa modelo NR1322, estufa marca Fanem modelo MOD50213-C, balança analítica marca Marte modelo AY220, espectrofotômetro UV/VIS de bancada marca Biospectro modelo SP-22, espectrofotômetro UV/VIS de bancada marca Kasuaki, ultrafreezer marca Indrel modelo IULT90D, liofilizador marca Liotop modelo LI08, seladora marca R. Baião modelo SELAMULT, bomba de vácuo marca Newpump modelo 1110, agitador magnético marca Fisatom modelo 752A, reator de aço inoxidável com jaqueta capacidade de 5 litros, reator de vidro com jaqueta capacidade de 10 litros, termômetros de álcool e de mercúrio, vidrarias em geral, contentores plásticos, leito de filtração, capelas.

4.4.3 Testes preliminares

Os testes preliminares consistiram na avaliação físico-química apenas do subproduto da extração de CMS bem como o isolado obtido processando esta através da metodologia definida por Nolsoe e Undeland (2009) e adaptada por Freitas et al (2011), sem controle da variável temperatura do processo em vistas da tentativa de eliminação de calor do processo de variação do pH.

4.4.4 Preparo da matéria-prima

A MP recebida foi descongelada e separada quanto à sua origem (cabeça, corte condensado no processo de abate ou, subproduto da extração da carne mecanicamente separada) e tomada sua massa. As partes então foram dosadas quanto ao percentual obtido junto à indústria, conforme exposto na Tabela 5, da sua composição no subproduto em relação ao peso vivo do frango, convertendo então em percentual sobre o montante total de amostra. A MP foi processada em equipamento de desossa mecânica, sendo a moagem concomitante para todas no processo e o produto obtido disposto em monoblocos plásticos para nova homogeneização e tritura.

Após, a MP foi novamente triturada em liquidificador tipo “Blender” e homogeneizada manualmente em monoblocos de plástico. Finalizado o processo, a massa obtida foi embalada em sacos plásticos de polietileno, selados e congelados (-18 °C) para posterior análises. No momento das análises a MP foi descongelada em ambiente climatizado a 4 °C por um período máximo de 24 h e novamente triturada em liquidificador tipo “Blender” antes da sua utilização nas análises e processos realizados neste trabalho.

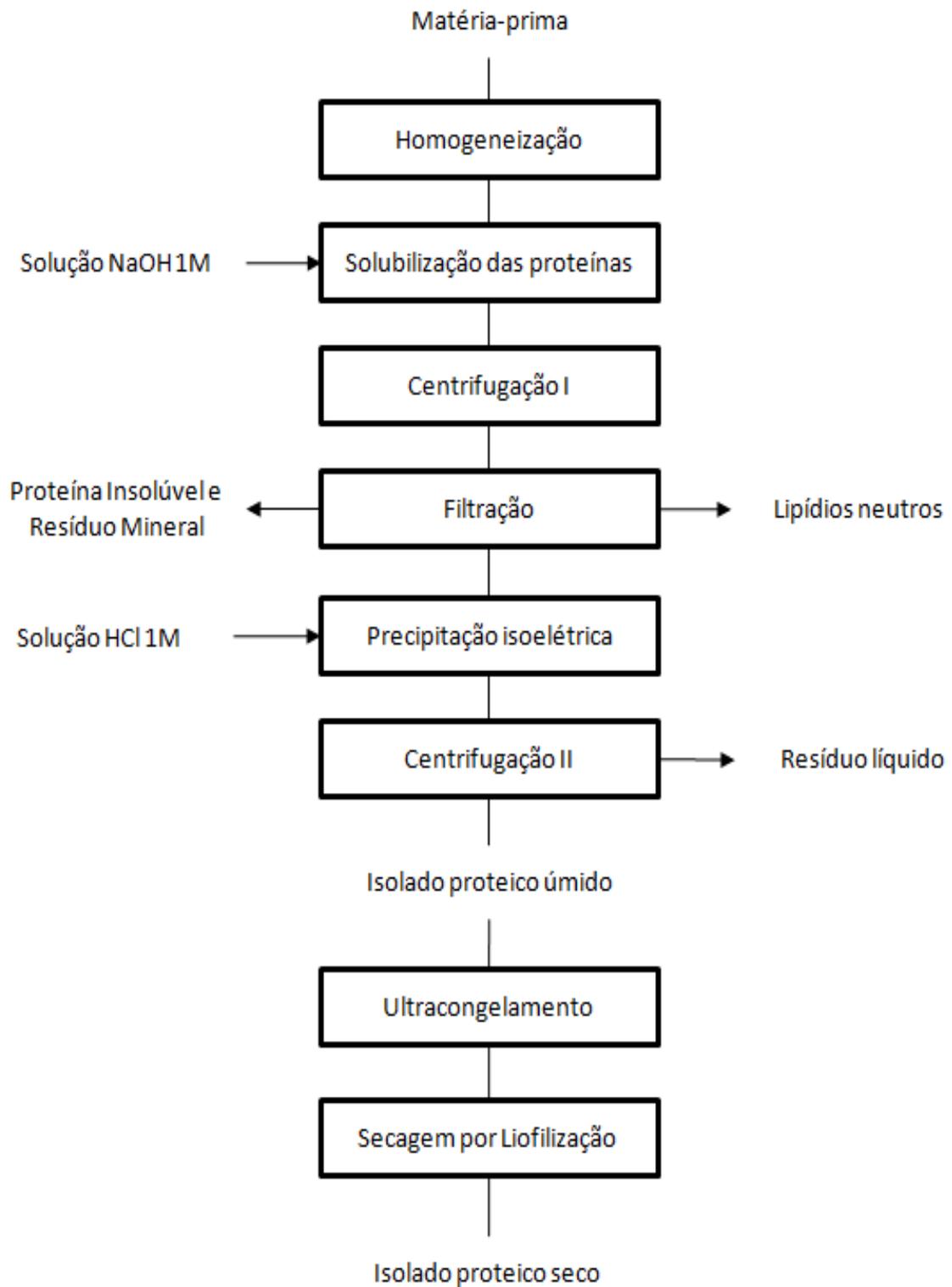
4.4.5 Processo de extração das proteínas

A metodologia de extração das proteínas em bancada foi definida por Nolsoe e Undeland (2009) e adaptada de Freitas et al. (2011) e seu fluxograma é demonstrado na Figura 5.

4.4.4.1 Homogeneização

Previamente ao processo de homogeneização, a água destilada utilizada foi resfriada a temperatura próxima a zero grau para manutenção da temperatura baixa necessária ao processo. A MP então foi homogeneizada com parte da água destilada resfriada em liquidificador tipo “Blender” por 2 minutos. Após, a mesma foi acondicionada em reator de aço inoxidável com jaqueta acoplado em banho ultratermostático, para manutenção da temperatura do meio em até 4 °C e utilizando agitador eixo-hélice com rotação de 100 rpm para homogeneização total da MP com a água destilada resfriada, conforme demonstrado na Figura 6. A proporção de água e MP utilizada foi de 1:9 (m/v).

Figura 5 – Fluxograma do processamento em bancada de obtenção de isolado proteico.



Fonte: adaptado de Freitas et al. (2011).

Figura 6 – Equipamentos utilizados para o processo de variação de pH.



Fonte: o autor.

4.4.4.2 Solubilização das proteínas

A solubilização das proteínas ocorreu em meio alcalino com pH indicado de 11,0. Como agente alcalinizante do meio, utilizou-se NaOH 1 M até que o meio atingisse o pH indicado, utilizando-se potenciômetro de bancada. Após estabilização do pH, a mistura permaneceu em agitação constante a 100 rpm pelo período de 20 minutos em sistema composto por agitador eixo-hélice e termômetro, com a manutenção da temperatura máxima de 2 ± 2 °C com auxílio de banho ultratermostático.

4.4.4.3 Centrifugação I

Finalizado o período da solubilização das proteínas, a mistura foi retirada do reator e disposta em tubos de centrífuga para etapa de centrifugação. A primeira centrifugação ocorreu à velocidade máxima do equipamento (14308 xg) durante 20 minutos em centrífuga refrigerada de piso de copos a uma temperatura máxima de 4 °C. Nesta etapa há a separação de três fases: inferior (sólida), contendo as proteínas e materiais insolúveis no processo; fase

intermediária (líquida), contendo as proteínas solúveis (miofibrilares e sarcoplasmáticas); e a fase superior, contendo os lipídios neutros.

Após centrifugação, com auxílio de espátula, foi retirado o sobrenadante (lipídios) e efetuou-se uma filtração qualitativa, permanecendo para o processo subsequente apenas a fase líquida, a qual contém as proteínas solubilizadas. As outras duas fases, correspondentes ao material insolúvel e aos lipídios, foram pesadas e descartadas.

4.4.4.4 Precipitação das proteínas

A fase intermediária (líquida), que foi obtida na centrifugação I, correspondente às proteínas solúveis no processo, foi então submetida à precipitação isoelétrica da proteína utilizando HCl 1 M como agente acidificante do meio a um pH de 5,25, com auxílio de pHmetro de bancada, por um período de 20 minutos com agitação constante de 100 rpm em um sistema composto por um agitador eixo-hélice e termômetro, mantendo-se a temperatura máxima de 2 ± 2 °C com auxílio de banho ultratermostático.

4.4.4.5 Centrifugação II

Terminado o período da precipitação isoelétrica, a mistura foi retirada do reator e disposta em tubos de centrífuga para etapa de centrifugação. A segunda centrifugação foi realizada a velocidade centrífuga máxima do equipamento (14308 xg) por um período de 20 minutos em centrífuga refrigerada de piso de copos à temperatura máxima de 4 °C, para separar a fração líquida da fração sólida ou proteica, facilitando a coleta das proteínas precipitadas.

4.4.4.6 Obtenção de isolado proteico úmido

O precipitado obtido (IPF) foi disposto em frascos para posteriores avaliações físico-químicas e tecnológicas. As determinações físico-químicas procederam com o produto úmido. Já para as determinações quanto à qualidade do IPF obtido (índices de acidez, peróxidos e TBARS) e as caracterizações nutricionais (digestibilidade e perfil de aminoácidos) e funcionais (solubilidade, capacidade de retenção de água e de óleo), o IPF passou por processo de ultracongelamento à temperatura de -80 °C por 48 horas e liofilização em liofilizador, por 48 horas com pressão 5 µmHg, para manutenção das características das proteínas e dos lipídios a serem avaliados.

4.4.6 Avaliação da centrifugação no processo de extração das proteínas

Visto que o objetivo deste trabalho foi fazer um aumento de escala do processo laboratorial de variação do pH para obtenção de isolados proteicos de frango e, a etapa de centrifugação I é de suma importância para efetividade de separação dos componentes indesejáveis ao produto final IPF (como gorduras, matéria mineral e materiais insolúveis),

efetuou-se o estudo de variáveis desta etapa para sua avaliação de efetividade. As variáveis independentes (fatores) foram a velocidade centrífuga (xg) e o tempo de centrifugação (minutos) e como variáveis dependentes (respostas) os teores de proteína e gordura, além do rendimento proteico do IPF obtido. Foi então desenvolvido um planejamento experimental fatorial do tipo 2², onde a Tabela 6 apresenta as variáveis utilizadas e seus níveis codificados.

Tabela 6 – Variáveis utilizadas no planejamento experimental para obtenção do isolado proteico de frango.

Variáveis Codificadas	Variáveis reais	
	Velocidade Centrífuga (xg)	Tempo (min)
-1,41	9000	15
-1	10883	18,55
0	11656	20
+1	12426	21,45
+1,41	14308	25

A velocidade centrífuga definida para o ponto axial positivo (+1,41) foi de 14308 xg, valor este máximo do equipamento centrífuga das dependências do LTA para o rotor e os copos disponíveis neste equipamento. Fixou-se o tempo de 20 min para o ponto central (0), face este ser o descrito pela metodologia de Freitas et al (2011) em seu processo. Para medir a eficácia do processo, devemos avaliar em conjunto três respostas: rendimento do processo, teor de proteína obtida e redução de lipídios da matriz. O ideal de processo é buscar um elevado rendimento, com teor de proteína acima de 80% e reduzido teor de lipídios, tornando desnecessários cuidados posteriores ao produto obtido, como uso de antioxidantes.

Como sequência desse planejamento, após análise estatística utilizando o programa Statistica 5.0, foi efetuada avaliação das variáveis significativas no processo de isolamento das proteínas e, em caso de conformidade dos testes estatísticos, foi desenvolvida superfície de resposta do processo.

4.4.7 Aumento de escala no processo de variação do pH

Para o aumento de escala do processo de variação do pH, foi feito um acréscimo de quatro vezes o processo de bancada, utilizando-se 800 g de MP em reator encamisado de 10 L, para a produção utilizando metodologia proposta por Nolsoe e Undeland (2009) e adaptada por Freitas et al. (2011) para o processo de variação de pH. Foram avaliadas como respostas do processo o rendimento de processo, teores de proteína, umidade, lipídios e

matéria mineral; as propriedades de qualidade como índice de acidez, índice de peróxidos e TBARS, além da digestibilidade da proteína apresentada pelo isolado proteico.

4.4 Metodologia analítica

4.4.1 Solubilidade das proteínas

A solubilidade das proteínas da MP utilizada foi determinada de acordo com o método adaptado utilizado por Tadpitchayangkoon, Park e Yongsawatdigul (2010), com variação de pH (2; 3; 4; 4,5; 5; 5,25; 5,5; 5,75; 6; 7; 9; 11 e 12). Pesou-se 0,5 g de amostra em um béquer de 50 mL, tomando-se cuidado para não haver partes sólidas (fragmentos ósseos) na amostra para não distorcer os resultados. Adicionou-se então 2 mL de cloreto de sódio (NaCl) 0,1 M, homogeneizando com auxílio de bastão de vidro e após adicionou-se 48 mL de água destilada. O pH foi ajustado com ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) em concentrações de 0,1 M e 1 M respectivamente, com auxílio de pHmetro de bancada. A suspensão foi mantida em agitação por 30 minutos com agitador magnético, mantendo-se o pH constante conforme a faixa analisada. Mediu-se o volume final após agitação com auxílio de proveta e em seguida centrifugou-se a dispersão a 8667 xg por 20 minutos em centrífuga de tubos. O sobrenadante foi filtrado e o teor de proteína solúvel foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteau de acordo com Lowry et al. (1951) adaptado em espectrofotômetro UV/VIS com comprimento de onda de 660 nm. A solubilidade (S) da proteína foi calculada conforme a Equação 1. Para o cálculo de proteína no sobrenadante utilizou-se curva padrão de albumina variando de 0,0417 a 0,417 mg de albumina/mL.

$$S (\%) = \frac{\text{Proteína do Sobrenadante}}{\text{Proteína presente na amostra}} \times 100 \quad (1)$$

Os valores de baixa solubilidade foram reafirmados por método de adição sucessiva da proteína do extrato obtido juntamente com adição de uma solução de concentração conhecida de albumina de 0,2496 mg.

4.4.2 Avaliação de sais no processo

Utilizando a mesma metodologia proposta Nolsoe e Undeland (2009) e adaptada por Freitas et al. (2011), foram feitos três ensaios, adicionando-se sais aos processos de solubilização e de precipitação isoelétrica, buscando avaliar a possível influência da força iônica (*salting-in* e *salting-out*) no processo de isolamento proteico.

Conforme descrito por Timashef e Arakawa (1988) para conceituar os efeitos de *salting-in*, para este ensaio durante a solubilização proteica foram preparadas duas soluções

salinas de NaCl, sendo uma com 0,25 M e outra com 0,5 M em substituição à água destilada utilizada no processo, utilizando como respostas o rendimento em massa e os teores de umidade, proteína e lipídios do IPF obtido.

Para o ensaio de avaliação de *salting-out*, durante o processo de precipitação isoelétrica, o volume de mistura foi medido em provetas e então foi adicionada a quantidade salina de NaCl necessária para torná-la uma solução com 1,25 M, efetuando a mistura do sal até total solubilização e então o mesmo foi processado na etapa de precipitação isoelétrica normal. Timashef e Arakawa (1988) afirmam que para que ocorresse o efeito de *salting-out* o meio deve conter acima de 1 M de sais dissolvidos. Como respostas foram utilizadas o rendimento em massa, os teores de umidade, proteína e lipídios do IPF obtido.

4.4.3 Rendimento do processo

O rendimento do processo foi calculado através da relação entre a massa de IPF seco obtido e a massa da MP seca utilizada no processo, conforme descrito por Freitas (2011) e definido pela Equação 2.

$$\text{Rendimento massa (\%)} = \frac{\text{Massa seca de IPF}}{\text{Massa seca de MP}} \times 100 \quad (2)$$

Para efeito comparativo também foi calculado o rendimento proteico em base seca do processo, sendo considerado pela Equação 3.

$$\text{Rendimento proteico (\%)} = \frac{\text{Massa proteína seca do IPF}}{\text{Massa de proteína seca da MP}} \times 100 \quad (3)$$

4.4.4 Composição Proximal

A composição proximal foi desenvolvida conforme as metodologias descritas por AOAC (2000), para umidade em estufa a 105 °C (método 950.46), para proteína bruta pelo método micro-Kjeldahl (fator de conversão 6,25) (método 928.08), para lipídios totais em extrator de Soxhlet (método 960.39) e, para matéria mineral com incineração em mufla a 550 °C (método 920.153).

4.4.5 Índice de Acidez

O índice de acidez foi determinado segundo metodologia indicada pela Portaria nº 108 (BRASIL, 1991), onde a amostra diluída em álcool etílico neutralizado é homogeneizada por um período de 45 minutos, filtrada e então titulada com solução de NaOH padronizada 0,092 M até ponto de viragem e através do volume de hidróxido utilizado, calcula-se o índice de acidez em meq/g através da Equação 4.

$$\text{I.Acidez} = \frac{(\text{volume hidróxido amostra} - \text{volume do branco}) \times \text{molaridade hidróxido}}{\text{massa da amostra utilizada}} \quad (4)$$

4.4.6 Índice de Peróxidos

O índice de peróxidos foi analisado segundo metodologia indicada pelo Instituto Adolfo Lutz (ITAL, 2008), onde a gordura da amostra foi extraída com solventes orgânicos pela metodologia de Bligh e Dyer (1959). A solução de gordura então é recolhida em funil de separação, filtrada e medido seu volume de filtrado. Do filtrado foi retirada uma alíquota, a qual foi reagida com ácido acético P.A. adicionada de solução saturada de iodeto de potássio (KI) e então titulada com solução de tiosulfato de sódio padronizado 0,1 M até que a coloração amarelada diminua. Adiciona-se solução de amido 1% e continua-se a titulação até desaparecimento da coloração azul, considerando o volume de tiosulfato utilizado para o cálculo do índice de peróxidos, conforme descrito na Equação 5.

$$\text{I.Peróxido} = \frac{(\text{volume tiosulfato amostra} - \text{volume do branco}) \times \text{molaridade tiosulfato}}{\left(\frac{\text{massa amostra}}{\text{volume filtrado}}\right) \times \text{alíquota de amostra}} \quad (5)$$

4.4.7 Índice de substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O cálculo das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi determinado segundo a metodologia Vyncke (1970), que consiste em medir a formação do produto da reação de oxidação (malonaldeído), efetuando uma solubilização da amostra em ácido tricloroacético (TCA) 7,5%, para depois filtrar e centrifugar a amostra retendo os sólidos, reagir à mesma com ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,02 M em meio aquecido a 80 °C por 30 minutos, e após isso se efetuou a leitura em espectrofotômetro UV/VIS a 538 nm, expressando os resultados em mg de malonaldeído (MDA) por g de amostra. Para o cálculo, foi preparada uma curva padrão utilizando-se como padrão o tetraetoxipropano (TEP) variando a concentração de $7,2 \times 10^{-5}$ a $7,2 \times 10^{-4}$ mg de TEP/mL.

4.4.8 Solubilidade do IPF e Capacidade de Retenção de Água (CRA)

A solubilidade do IPF foi determinada segundo método adaptado de Fonkwe e Singh (1996), onde tomou-se a massa de 0,5 g da amostra e foi adicionado 50 mL de água destilada. As dispersões foram dispostas em agitador magnético por 30 minutos com mensuração contínua do pH com auxílio de potenciômetro de bancada. O pH foi ajustado para 3, 5, 7, 9 e 11 com auxílio de HCl e NaOH 0,1 a 1 M. Após término, a dispersão foi centrifugada em centrífuga de tubos à velocidade de 8667 xg por 25 minutos. O sobrenadante foi filtrado em cadinho sinterizado previamente tarado, sendo o volume de sobrenadante mensurado em proveta. As alíquotas do sobrenadante foram tomadas para identificar a quantidade de proteínas solúveis pelo método adaptado de Lowry et al. (1951) em

espectrofotômetro com comprimento de onda de 660 nm. Para o cálculo de proteína no sobrenadante utilizou-se curva padrão de albumina variando de 0,0417 até 0,417 mg de albumina/mL. A percentagem de solubilidade foi calculada conforme Equação 1.

A capacidade de retenção de água se deu por gravimetria entre a massa obtida no cadinho sinterizado dividido pela massa de proteína da amostra em todos os pH analisados, mensurando a quantidade de água absorvida no processo, sendo esta calculada pela Equação 6.

$$\text{CRA (\%)} = \frac{\text{Massa do cadinho sinterizado} - \text{tara do cadinho}}{\text{Massa da amostra} \times \text{proteína da amostra}} \times 100 \quad (6)$$

4.4.9 Capacidade de retenção de óleo (CRO)

Para determinação da CRO foi utilizada a metodologia descrita por Fonkwe e Singh (1996), onde foram tomados 0,5g de amostra e adicionados 20 mL de óleo de soja (marca Soya, Bunge, Rondonópolis, MT, Brasil). A mistura foi agitada com auxílio de agitador magnético por 30 minutos e centrifugada em centrífuga de tubos a 8667 xg por 25 minutos. A diferença entre o volume de óleo adicionado e o volume de óleo não retido foi considerada como o volume de óleo retido e foi expressa como a quantidade de óleo retido por grama de proteína presente no produto, de acordo com a Equação 7.

$$\text{CRO (\%)} = \frac{\text{Volume de óleo retido}}{\text{massa de proteína}} \times 100 \quad (7)$$

4.4.10 Perfil de aminoácidos

Os solventes utilizados para a separação dos aminoácidos foram: solvente A - acetato de sódio (NaAc) 0,14 M com 0,06% de trietilamina (TEA), pH 5,7 (filtrado em membrana 0,45µm) e solvente B - Acetonitrila (AcN) e água na proporção de 60:40 (v/v). Os aminoácidos foram separados segundo o protocolo de separação desenvolvido por BIDLINGMEYER, COHEN & TARVIN (1984).

Para este tipo de separação utilizou-se uma coluna C18 Pico-Tag Waters com dimensões de 3,9x150 mm. A cromatografia foi desenvolvida à temperatura constante de 38,0±0,1 °C, em equipamento CM4000 da Laboratory Data Control (Milton Roy Co.), com sistema de bombas binárias, espectrofotômetro com comprimento de onda fixo em 254 nm e célula de fluxo contínuo de 10 µL.

Os dados foram coletados em um computador com o programa ThermoChrom III, da Thermo Separation Products. Um gradiente crescente de acetonitrila foi utilizado para esta separação, ver Tabela 7, com um fluxo de 1,0 mL/min. A existência de um tempo de

equilíbrio de 10 minutos em 5% de solvente B logo após a limpeza da coluna com 100% do solvente B é crítico para haver reprodutibilidade dos tempos de eluição dos derivados feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa).

O método utilizado no Centro de Química de Proteínas apresenta um coeficiente de variação entre duplicatas $\leq 10\%$ (critério de confiança do método). A curva dose-resposta do padrão apresenta uma relação linear entre a área do pico e a quantidade de aminoácidos derivados na faixa de 25 a 2500 pmol de cada aminoácido aplicado na coluna.

Tabela 7 – Gradiente de separação para a eluição dos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa)

Tempo (min.)	%B	Fluxo (mL/min)	Tempo (min.)	%B	Fluxo (mL/min)
0,0	10	1,0	10,0	54	1,0
2,2	15	1,0	11,5	100	1,0
2,5	17	1,0	12,0	100	1,0
3,0	21	1,0	12,3	100	1,5
5,5	26	1,0	17,0	100	1,0
6,0	35	1,0	17,5	10	1,0
6,5	36	1,0	27,5	10	1,0
8,0	42	1,0			

4.4.11 Digestibilidade das proteínas

A avaliação da digestibilidade proteica dos isolados obtidos procedeu-se segundo descrito na metodologia indicada pela Portaria nº 108 (BRASIL, 1991), onde 1 g da amostra passou por digestão em meio ácido com ação da enzima pepsina 1:10000 a 0,2%, pelo período de 16 h em agitador tipo “Shaker” com temperatura controlada de 45 °C e agitação 100 rpm. Finalizado o período, a amostra foi filtrada a vácuo em cadinho sinterizado contendo lã de vidro previamente tarado. O erlenmeyer onde se deu a digestão foi lavado por 3 vezes com água destilada aquecida a 45 °C e duas vezes com acetona P.A. passando todas as lavagens pelo leito de filtragem do cadinho sinterizado. Os cadinhos então foram dispostos em estufa DeLeo a 105 °C pelo período de 1 hora, sendo o valor de digestibilidade obtido através da diferença de massa obtida no cadinho e a massa de amostra inicial, conforme descrito na Equação 8.

$$\% \text{Digestibilidade} = \frac{\text{massa final-tara cadinho}}{\text{massa amostra}} \times 100 \quad (8)$$

4.6 Análise estatística

Foram calculadas as análises de variância (ANOVA) e o teste t e de Tukey para determinar diferenças significativas de todas as propriedades obtidas para MP, FA e IPF, no intervalo de 95% de confiança.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testes preliminares

Em vista de que o processo de extração da carne mecanicamente separada (CMS) de frango consiste na desossa mecânica de cortes de frango, em seu grande montante o dorso, com ou sem pescoço e, com ou sem gordura abdominal, gera-se o produto CMS e o subproduto da sua extração. O dorso de frango consiste em um corte provindo da desossa quase total, ainda contendo carne aderida, onde ainda se pode extrair em torno de 78% de carne para obtenção da CMS e posterior uso em produtos industrializados à base de carne (OLIVO, 2006).

Como teste preliminar deste trabalho, foi avaliado como MP apenas o subproduto do processo de extração da CMS, para tanto foi realizada a avaliação da composição proximal desta MP, fornecido pelo mesmo frigorífico que cedeu o material proposto neste estudo. A Tabela 8 apresenta os resultados para a composição proximal do subproduto da extração da carne mecanicamente separada de frango bem como do isolado proteico obtido a partir desta.

Tabela 8 – Composição proximal do subproduto da extração da carne mecanicamente separada de frango e do isolado proteico obtido a partir desta.

Amostra	Componente* (g/100 g)				Rendimento Massa (%)
	Proteína	Gordura	Matéria Mineral	Carboidratos**	
Subproduto	42,6±3,2	18,6±0,7	38,5±3,5	0,3	-
Isolado	65,4±1,2	17,9±0,9	2,6±0,2	14,1	40,0

* Valores para os componentes expressos em base seca (B.S.)

** Carboidratos calculados por diferença.

Os resultados apontaram que a MP proposta inicialmente apresentava-se como boa fonte de proteínas com 42,6% e com teor de lipídios como baixo componente (18,6%), apresentando teor de cinzas de 38,5%. A baixa incidência de gordura se dá, visto que a maior parte da gordura abdominal aderida ao dorso no processo de extração prossegue juntamente com a CMS. Seu alto conteúdo mineral se dá, visto que este subproduto é em quase sua totalidade ossos e cartilagens de frango com resíduos de carne aderida no processo de esmagamento.

Os dados obtidos apontam que o IP não se comportou como isolado proteico e sim, como um concentrado proteico, visto que o teor de proteínas mínimo para um produto ser considerado isolado proteico seria de 90%. Não houve redução lipídica significativa, visto que, neste teste de bancada, não foram tomadas todas as exigências de processo de variação

de pH quanto à temperatura do meio (4 °C). A redução significativa do processo foi na matéria mineral, o que reforça o afirmado por Park et al (2003), que há uma grande remoção de partes sólidas insolúveis devido à centrifugação na etapa anterior à precipitação proteica em seu ponto isoelétrico. O rendimento do processo em massa ficou em 40%, o que não apresentaria grande valia em processo industrial, visto que o rendimento de obtenção de farinhas é de 47%, conforme Costa, Romanelli e Trabucco (2008), sendo que os mesmos apontam que o rendimento de massa entre vísceras e farinha é de 14%.

5.2 Farinha de Vísceras

A farinha de vísceras é hoje comercialmente um produto utilizado para compor ração animal para granjas (animais de abate) e para animais de estimação (*pet food*). É obtida através de processo de cocção de subprodutos do abate de frango, em reatores com temperatura controlada. Esta farinha representa aproximadamente 3,3% do peso vivo de frango (SABINO e FINZER, 2006).

De acordo com o descrito, foi adquirida farinha de vísceras obtendo-se os valores de composição proximal em base seca exibidos na Tabela 9. Pode-se visualizar que todos os valores estão condizentes com a legislação vigente, exibida na Tabela 1 (BRASIL, 1988), que exige mínimo 50% de proteína bruta e umidade máxima de 8%, estando estas aptas para serem comercializadas nos padrões nacionais. Os valores baixos de umidade são importantes para a manutenção do controle microbiológico do produto, não necessitando nenhum tipo de conservação durante sua vida útil. Os teores proteicos são considerados de proteínas concentradas, visto não alcançarem os 90% para serem considerados isolados proteicos.

Tabela 9 – Composição proximal das farinhas de vísceras comerciais em base seca.

Amostra*	Componente (g/100 g)			
	Proteína	Lipídios	Matéria Mineral	Carboidratos**
A	67,0±3,6	22,0±1,5	10,2±0,2	0,8
B	72,6±1,4	19,3±4,1	9,7±0,1	0,0
C	67,5±1,6	17,8±1,6	15,0±0,2	0,0

* Cada letra diferente, identifica fornecedor diferente.

** Carboidratos calculados por diferença.

O teor de matéria-mineral demonstra a quantidade de resíduos ósseos e cartilagens que passaram pelo percolador após o processo de hidrólise, demonstrando que não há muita efetividade neste tipo de separação física em relação a um processo de centrifugação. Estes podem causar um rejeito por parte do animal à ração proposta por conta de fragmentos e os chamados “finos”, sugerindo-se utilizar granulometria de no mínimo Tyler 6 (3,4 mm).

O teor de lipídios é um ponto chave para farinhas, pois devido à oxidação lipídica destes compostos, torna-se necessário o uso de antioxidantes para manutenção da vida útil dos mesmos ante a oxidação (SILVA, 2009). A oxidação das gorduras pode causar danos no trato digestivo do animal durante o processo de criação e manejo, diminuindo as capacidades de absorção dos nutrientes e das proteínas e, conseqüentemente, o desenvolvimento de peso no mesmo (BELLAYER, 2005).

Os dados obtidos para as análises de composição proximal condizem com os expostos por Rostagno et al. (2011) em suas tabelas brasileiras para aves e suínos de composição de alimentos e exigências nutricionais. Já Fernandes (2011) encontrou valores médios bastante próximos para proteína (68%), lipídios (14,4%) e matéria mineral (13,6%) em vísceras de um mesmo frigorífico em diferentes estações do ano.

Costa, Romanelli e Trabucco (2008) analisaram a produção em laboratório de farinhas de vísceras de frangos, avestruzes e emas, obtendo para as farinhas de frango valores de 5,5% de umidade, 60,7% de proteína, 27% de lipídios e 4,3% de matéria mineral. Os resultados de matéria mineral diferenciam-se dos obtidos nesta dissertação, visto que no processamento, os autores não utilizaram os subprodutos da extração da CMS, como corriqueiramente as indústrias o perfazem, acarretando no aumento do conteúdo mineral pela sua grande porção de ossos e cartilagens.

A Tabela 10 demonstra os valores obtidos para os índices de qualidade (acidez, peróxidos e TBARS) das farinhas de vísceras de frango.

Tabela 10 – Índices qualitativos das farinhas de vísceras de frango comerciais.

Amostra*	Índice Acidez (meq/g Amostra)	Índice Peróxidos (meq/g Amostra)	TBARS (mg MAD/g Amostra)
A	2,0±0,1	0,049±0,0	0,128
B	1,6±0,0	0,002±0,0	0,041
C	1,9±0,1	0,003±0,0	0,089

* Cada letra diferente, identifica fornecedor diferente.

Ao se verificar os padrões estabelecidos pela legislação nacional descrita por BRASIL (1988), podemos afirmar que o índice de acidez das farinhas analisadas apresenta-se dentro do limite máximo determinado que é de até 5 meq/g Amostra. Resultados na mesma faixa (1,5 a 2,0) foram encontrados por Fernandes (2011) para farinhas de vísceras em diferentes condições climáticas durante o ano.

Os valores para o índice de peróxidos são bons indicadores quanto ao grau de oxidação dos lipídios e sua estabilidade durante a vida útil, porém, como já descrito, as farinhas comerciais são adicionadas de antioxidantes como coadjuvantes na sua manutenção pelo período de tempo de sua vida útil. O índice de TBARS não é convencional para medição em farinhas ou produtos de animais terrestres. Os valores obtidos nas análises não acompanham os valores do índice de peróxidos. As metodologias de análise são complementares: enquanto o índice de peróxido mede o grau de oxidação das gorduras, o índice TBARS mede a formação do produto dessa oxidação (malonaldeído). Costa, Romanelli e Trabucco (2008) encontraram valores de TBARS de 0,15 mg MAD/g de Amostra e de acidez de 9,4 meq NaOH/g em farinha de vísceras processadas pelos próprios autores, valores que estiveram acima dos encontrados neste trabalho.

5.3 Composição do subproduto em relação ao peso vivo e caracterização físico-química

Como o subproduto da carne mecanicamente separada é uma composição diminuta presente no subproduto de um abatedouro e, como o seu rendimento de massa em base úmida de IP obtido foi de 40%, mesmo sem avaliação profunda de custos, o processo tornar-se-ia aparentemente inviável, sendo necessária uma grande quantidade de matéria-prima para justificar seu processamento em uma planta fabril. Em face disso, sugeriu-se primeiramente utilizar todo o subproduto não comestível de um abatedouro de frangos, que convencionalmente é convertido através de processos de cocção em farinha de vísceras.

Em parceria com um frigorífico do Estado do RS, obteve-se dados produtivos, a fim de quantificar em percentuais o subproduto não comestível em cima do peso vivo do frango. Obtêm-se então os valores descritos na Tabela 11, tomando-se por base o peso vivo de frango em 1,475 kg, valor informado como peso médio de frango em um abate diário de 40.000 aves, conforme dados do estabelecimento produtor parceiro.

Tabela 11 – Resultados obtidos junto à indústria para rendimentos do abate de frango.

Parte do subproduto	Massa de subproduto (Kg)	Percentual do subproduto (%)	Composição Subproduto (%)
Vísceras + Penas	7670	13,0	76,3
Cabeças	1180	2,0	11,8
Cortes Condensados	767	1,3	7,6
Subproduto extração CMS	442,5	0,8	4,4

Pode-se verificar que o pacote total de subproduto perfaz o valor de 17,1% em relação ao peso da ave viva, valor que condiz com o apresentado por Olivo (2006), sendo que,

destes valores, 8,5% corresponde às penas e 6,5% corresponde às vísceras. O referido autor comenta que a estimativa da produção de subprodutos avícolas parte do seguinte princípio: o rendimento de peso da carcaça de frangos, a partir do peso vivo, é de aproximadamente 75% (ave viva – subprodutos), sem considerar a absorção de água que ocorre nos processos de resfriamento em *chiller*. Assim, para a obtenção da carcaça com miúdos comestíveis, o rendimento é de aproximadamente 83%, ou seja, aproximadamente 17% da ave constituem-se em resíduos não comestíveis.

Já conforme Picchi (1994) citado por Ferroli et al (2001) é fácil calcular a quantidade de subprodutos gerada em um abatedouro, bastando considerarem-se as seguintes percentagens sobre o peso da ave viva: penas (7,47%), sangue (0,79%), vísceras (7,16%), condenações sanitárias (1,21 %) e resíduos (0,37%).

Com base nos dados expostos na Tabela 11 para percentuais da composição do subproduto, foram solicitadas ao frigorífico, parceiro deste estudo, as amostras para compor a matéria-prima, obedecendo aos valores descritos para percentuais sobre o montante total do subproduto. A matéria-prima então utilizada para a produção de isolado proteico foi composta primeiramente de vísceras, cabeças, cortes condenados no processo de abate e resíduos da extração de CMS. Estes foram recebidos nas dependências do laboratório e analisados quanto a sua composição proximal, conforme demonstra a Tabela 12.

Tabela 12 – Composição proximal da matéria-prima incluindo as vísceras.

Componente (g/100 g)	Média
Proteína	47,7±2,7
Lipídios	40,5±3,0
Matéria Mineral	10,9±0,9
Carboidratos*	0,9

* Carboidratos calculados por diferença.

A Tabela 12 demonstra que dispomos, de até 47% de proteína em base seca na matéria-prima proposta, caracterizando a mesma como uma possível boa fonte de proteínas para um processo de isolamento de proteínas por variação do pH.

O teor de lipídios em base seca apresenta valores de 40%, sendo uma matéria-prima com teor elevado de gordura, o que pode ocasionar problemas no processo de isolamento e cuidados especiais de temperatura na solubilização e na centrifugação I, a qual tem por intuito eliminar ao máximo este composto no processo, para que o produto final tenha o menor teor possível de gorduras. Pelos dados obtidos, o teor de matéria mineral deve girar em torno dos 10%, o que pode se dar visto às partes ósseas das cabeças, cortes condenados e

dos subprodutos da extração da CMS, conteúdo este que deve ser eliminado juntamente com as proteínas insolúveis no processo de centrifugação I.

5.3.1 Produção preliminar de IPF em bancada

Seguindo a organização proposta pelo trabalho, foi realizado o processo de isolamento das proteínas pelo método referenciado Nolsoe e Undeland (2009) e adaptado por Freitas et al. (2011), sendo composto de solubilização alcalina (pH 11,0) e precipitação isoelétrica ao pH proposto pela metodologia (5,5). A massa inicial de matéria-prima empregada foi 200 g.

Durante o processo, houve grande aglomeração da matéria-prima insolúvel no eixo do agitador, pelo fato de as vísceras serem compostas em sua grande totalidade de proteínas do estroma, como paredes do estômago, intestino, papo e traqueia, material este que foi retirado em sua totalidade no processo de centrifugação I. Após a centrifugação II do processo, não houve quantidade suficiente de proteínas isoladas, provando que há pouca proteína miofibrilar e sarcoplasmática na matriz proposta, conforme demonstrado na Figura 7.

Figura 7 – Isolado proteico obtido com a matéria-prima contendo vísceras de frango.



Fonte: o autor.

Através deste resultado, obtido no primeiro processamento de IPF, alterou-se a matriz proposta, que contém as vísceras de frango, por uma nova matriz, que não continha este subproduto do abate. A Tabela 13 apresenta a nova composição da matriz proposta, nas mesmas condições de abate estabelecidas na Tabela 11 apresentada e, por conseguinte, processar IPF segundo a mesma metodologia descrita Nolsoe e Undeland (2009) e adaptada por Freitas et al. (2011).

Tabela 13 – Composição do subproduto utilizado como matéria-prima para produção de isolado proteico de frango.

Parte do subproduto	Composição Subproduto (%)
Cabeças	49,4
Cortes Condenados	32,1
Subprodutos extração CMS	18,5

A inclusão das vísceras no processo também poderia acarretar uma alta contaminação da matéria-prima para obtenção de IPF, necessitando então que o processo de variação de pH fosse estudado também microbiologicamente. A Figura 8 apresenta os cortes recebidos para processamento de IPF antes do preparo da MP.

Figura 8 – Subproduto utilizado para processamento de isolado proteico de frango.



Fonte: o autor.

A Tabela 14 apresenta os valores obtidos para composição proximal do subproduto a ser processado para obtenção de IPF. Pôde-se visualizar que, com 46% de proteína bruta em base seca, a matriz apresenta-se interessante para isolamento das proteínas.

Tabela 14 – Composição proximal e índices de qualidade da matéria-prima (cabeças, cortes condenados no processo de abate e resíduo da extração da carne mecanicamente separada).

	Componente	Média
Físico-Químico	Proteína (g/100 g)	46,3±0,7
	Lipídios (g/100 g)	41,4±1,5
	Matéria Mineral (g/100 g)	12,9±0,8
	Carboidratos* (g/100 g)	0,0
Índices de Qualidade	Acidez (meq/g amostra)	2,5±0,082
	Peróxidos (meq/g amostra)	0,0011±0,001
	TBARS (mg MAD/g amostra)	0,0001

* Carboidratos calculados por diferença.

Na mesma ótica da MP contendo vísceras, os valores obtidos para lipídios apontam 41% em base seca, o que necessitará de uma boa proporção na razão de água (m/v) e na temperatura do processamento de solubilização (4 °C), para que haja uma melhor separação física deste componente no processo de solubilização e centrifugação. A matéria mineral não se alterou significativamente.

Verificou-se que o índice de acidez da MP está levemente alto, possivelmente pelo tempo de exposição do abate/processamento até seu congelamento no estabelecimento frigorífico parceiro. Os índices de peróxidos e TBARS estão baixos, demonstrando que não houve dano oxidativo nos lipídios da MP durante os processos de coleta e congelamento no abatedouro, descongelamento e processamento nas dependências do laboratório. Segundo Olivo (2006), todos os resíduos oriundos de estabelecimentos frigoríficos são de responsabilidade dos mesmos e devem ter seu processamento em até 24 horas a partir do abate e colheita, permitindo tempos maiores apenas em caso de estocagem frigorífica a 10 °C. O mesmo autor ressalta que o tempo de processamento é de vital importância para a qualidade do produto acabado.

5.4 Solubilização das proteínas

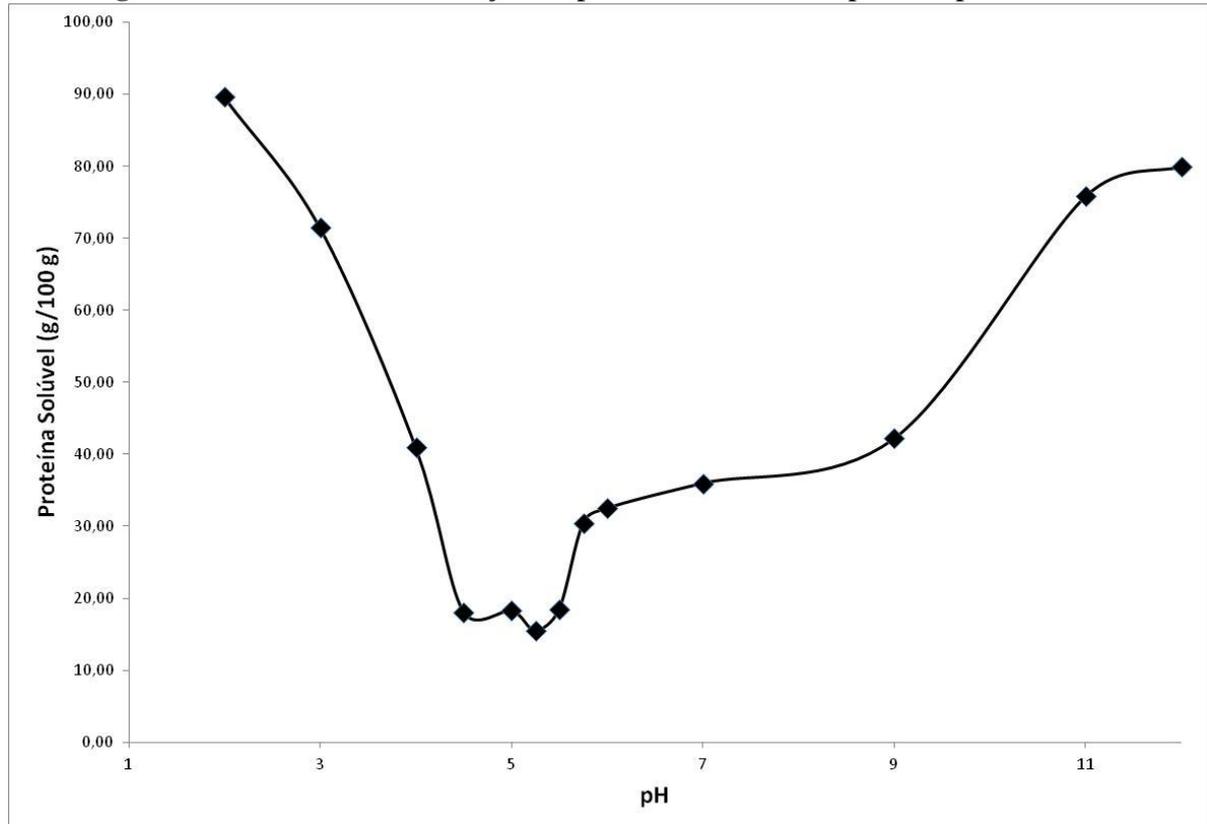
A definição de solubilidade de proteínas é o percentual do total das proteínas que foram extraídas por água ou solvente em condições específicas. Um dos maiores fatores influentes na solubilização das proteínas em condições aquosas é o pH da solução. Em condições alcalinas ou ácidas, as proteínas são carregadas negativa e positivamente, respectivamente, levando a uma repulsão entre as moléculas de proteínas, o que causa um aumento de solubilidade das mesmas (KRISTINSSON, 2001). Ante ao descrito, efetuou-se um estudo de solubilidade das proteínas da MP estudada, com o intuito de determinar o ponto isoelétrico (PI) para o processo de solubilização e da precipitação das proteínas.

O mesmo autor indica que, por outro lado, em pH próximos à neutralidade, as proteínas não carregam cargas específicas; a interação entre proteína-proteína aumenta, precipitando as mesmas no meio. Para o processo de extração proteica por variação do pH, esta característica é fundamental para a efetividade do processo. A Figura 9 apresenta a curva de solubilização das proteínas obtida com a MP estudada.

A partir da Figura 9, visualiza-se o seu comportamento em forma de U e pode-se notar bem distintamente a característica descrita por Kristinsson (2001) nos quais, em meios de pH ácidos ou alcalinos, alcança-se os maiores pontos de solubilidade das proteínas, chegando 89% em meio ácido e 80% em meio alcalino. Este comportamento também foi

visualizado na Figura 1. Moraes (2009) e Omana et al. (2010) apresentaram uma curva de solubilização proteica de comportamento igual ao deste estudo, com melhores pontos de solubilização em pH 3 e 11, utilizando como MP carne mecanicamente separada de frango e coxas e sobrecoxas de frango, respectivamente. Já Hrynets et al. (2011) obtiveram resultados invertidos quanto aos meios, sendo o meio alcalino de maior e o meio ácido de menor solubilização das proteínas.

Figura 9 – Curva de solubilização de proteínas da matéria-prima x pH do meio



O ponto de menor solubilidade, ou seja, o ponto isoelétrico (PI) deu-se no valor de 5,25, com 15% de solubilização proteica. Estes valores obtidos se dão pela presença de aminoácidos livres e nitrogênio não proteico. Valores semelhantes aos obtidos foram apresentados nas curvas de solubilização por Omana et al. (2010) (PI = 5,5) para coxas de frango e Hrynets et al. (2011) (PI = 5,5) para CMS de peru. Os valores de baixa solubilização de proteína foram confirmados com metodologia de adição sucessiva, juntamente com solução conhecida de albumina.

Com o comportamento de pH obtido, definiu-se o processo de variação do pH para o subproduto proposto, utilizando-se solubilização alcalina em pH 11,0 e precipitação isoelétrica em pH 5,25. O motivo da escolha do pH 11,0 para solubilização se dá em vista o meio ácido aumenta a susceptibilidade para oxidação lipídica do meio, conforme descreve

Kristinsson (2001) e confirmado por Kristinsson e Liang (2006) que apresentaram resultados de oxidação maiores do produto obtido em meio ácido em relação ao meio alcalino. Já a escolha do pH 5,25 foi pelo menor ponto de solubilidade obtido na curva apresentada na Figura 9, condizendo com a literatura estudada.

Kristinsson e Demir (2003) efetuaram estudo no índice de TBA de isolados em meio ácido, alcalino e surimi, obtendo resultados de maior oxidação em meio ácido, seguido do meio alcalino e por final surimi, esta não oxidando devido à retirada da hemoglobina em seus processos de lavagem. Já Kristinsson et al. (2005) demonstraram que o uso de solubilização alcalina desnaturou em menor quantidade a proteína obtida em relação à solubilização ácida das proteínas.

5.5 Produção de IPF em bancada (IPFB)

O processo de variação de pH é uma metodologia utilizada para obtenção de proteínas mais puras em pescados e resíduos de pescados bem como em matrizes vegetais, porém este estudo demonstra que também é possível a utilização desta metodologia para subprodutos de outras fontes senão aquáticas, como subprodutos do abate de frangos. Alguns estudos demonstram a melhor qualidade proteica em obtenções alcalinas (Kristinsson et al, 2005; Omana et al, 2010; Freitas et al, 2011) o que, por consequência, ajuda a definir a faixa de pH escolhida para este estudo, que foi baseada na curva de solubilização exposta na Figura 9.

Os isolados proteicos obtidos foram mensurados em seus rendimentos, caracterizados quanto a sua composição físico-química, índices de qualidade e propriedades funcionais e nutricionais. A Figura 10 apresenta o reator em processo de precipitação das proteínas e tubo de centrífuga contendo o IPF úmido após centrifugação II.

Figura 10 – Reator e isolado proteico úmido obtido no processo proposto.



Fonte: o autor.

O rendimento de processo foi efetuado em todos ensaios realizados, considerando o rendimento de massa e o rendimento de proteínas obtido. Um procedimento ótimo de extração requer uma alta solubilização das proteínas musculares e uma separação efetiva dos componentes indesejáveis no processo variação de pH. A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos para os rendimentos de processo do IPF obtido em produções de bancada.

Tabela 15 – Valores obtidos para rendimento de massa e de proteína no processo de isolamento proteico.

Rendimento Massa BS	Massa MP Úmido (g)	Umidade MP (%)	Massa MP BS (g)	Massa IPF Úmido (g)	Umidade IPF (%)	Massa IPF BS (g)	Rendimento (%)
	5074,9	66,7	1689,9	2430,6	88,8	272,7	16,1
Rendimento Proteico BS	Massa MP (g)	Proteína MP (%)	Massa Prot MP (g)	Massa IPF (g)	Proteína IPF (%)	Massa Prot IPF (g)	Rendimento (%)
	5074,9	49,8	2526,8	2430,6	82,8	2011,6	79,6

Onde: MP = matéria-prima; IPF = isolado proteico de frango; Prot = proteína; BS = base seca.

O processo de variação de pH resulta relativamente em alta recuperação de proteínas das MPs propostas. A solubilização alcalina usualmente apresenta maior recuperação proteica em relação ao tratamento ácido. Rendimentos proteicos têm sido reportados na literatura em uma faixa entre 42 e 90% (CHEN e JACZYNSKI, 2007; CHEN, TOU e JACZYNSKI, 2009; KRISTINSSON e LIANG, 2006; NOLSOE e UNDELAND, 2009; TASKAYA et al, 2009; FREITAS et al, 2011). Tais diferenças podem ser atribuídas

para as diferentes metodologias utilizadas para determinar a concentração proteica e seu rendimento de recuperação; o tipo de MP utilizada (tipo de animal ou se inteiro/subproduto), a força centrífuga utilizada durante o processo de isolamento, e a concentração relativa das proteínas sarcoplasmáticas solúveis em água. Moraes (2008), utilizando CMS de frango, obteve um rendimento em base úmida médio de no máximo 44%, não difere dos 47% obtidos neste estudo.

Kristinsson e Demir (2003) descreveram como a emulsificação das proteínas foi aumentada durante a etapa de solubilização alcalina, comparada com a solubilização ácida. Durante a etapa de centrifugação I é formada uma camada de gel acima dos compostos insolúveis e, esta camada constitui-se em proteína emulsificada com lipídios presentes na solução. Esta formação implica em um aumento no teor lipídico e, conseqüentemente, por uma diminuição no rendimento de proteínas do processo.

O rendimento proteico obtido condiz com o estudo apresentado por Omana et al (2010) que estudaram o processo de variação de pH aplicado em coxas de frango. Os autores realizaram quatro solubilizações em diferentes pH (10,5; 11; 11,5 e 12) e obtiveram rendimentos de 81,3; 83,2; 88,4 e 94,2%, respectivamente para cada pH. A diferença de rendimento em relação ao apresentado pelos autores citados acima foi ocasionada pelo tipo de MP utilizada, que continha maiores teores de outros componentes, em relação às coxas de frango (proteína das coxas de frango foi de 83% em base seca). Também o aumento do rendimento ocorreu devido ao desdobramento das proteínas em pH elevados, expondo os aminoácidos hidrofóbicos, o que, na precipitação, aumenta a agregação de proteínas, e conseqüentemente aumentando o teor proteico e o rendimento.

Nos ensaios realizados, foram utilizadas diferentes partes da mesma MP homogeneizada no preparo de amostra, porém ficou aparente nos resultados obtidos que a mesma apresentava diferentes resultados de massa de isolado proteico, apresentando maior formação de gel no processo de solubilização em determinados ensaios.

5.5.4 Avaliação físico-química

O estudo de isolamento proteico deste trabalho buscou produzir IPF de subprodutos de frango e avaliar este quanto à sua composição físico-química, seus índices de qualidade e suas propriedades funcionais e nutricionais. Os resultados obtidos então foram comparados a amostras de farinhas comerciais. A Tabela 16 apresenta a comparação entre a MP, as três farinhas analisadas e o IPFB, apresentando análise estatística pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%, avaliando diferenças significativas entre os resultados obtidos.

Tabela 16 – Composição proximal em base seca da matéria-prima, das farinhas comerciais e do isolado proteico de frango obtido em bancada.

Amostra*	Componente (g/100 g)**			
	Proteína	Lipídios	Matéria Mineral	Carboidratos***
MP	46,3±0,7 ^c	41,4±1,5 ^a	12,9±0,8 ^b	0,0
A	67,0±3,6 ^b	22,0±1,5 ^b	10,2±0,2 ^c	0,8
B	72,6±1,4 ^b	19,3±4,1 ^b	9,7±0,1 ^c	0,0
C	67,5±1,6 ^b	17,8±1,6 ^b	15,0±0,2 ^a	0,0
IPFB	84,5±3,3 ^a	9,7±1,8 ^c	2,5±1,0 ^d	3,3

Onde: MP = matéria-prima; IPFB = isolado proteico de frango obtido em bancada.

* Cada letra diferente (A, B, C), identifica fornecedor de farinha diferente.

** Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*** Carboidratos calculados por diferença.

Ao se analisar a Tabela 16, podemos visualizar que o IPFB apresentou o melhor resultado em proteína, ao alcançar o valor de 84,5% em base seca, diferente significativamente entre a MP e as farinhas (A, B e C). Este valor apresenta um ganho de 82,5% em relação à MP utilizada, demonstrando que o processo de variação do pH consegue efetivamente isolar proteínas e consequentemente diminuir outros compostos indesejáveis. Esta efetividade é comprovada ante os valores de lipídios e cinzas, os quais apresentam uma redução de 76% nos lipídios (de 41,4% da MP reduziu para 9,7% no IPFB) e de 85% no teor de cinzas (17,4% na MP passando para 2,5% no IPFB).

O bom desempenho na redução lipídica deu-se pelo fato de que houve um bom controle na temperatura do processo, onde a mesma nunca ultrapassasse a 4 °C, onde grande parte dos lipídios se solidificam, tornando-se em grande parte insolúveis e plausíveis de retirada no processo de centrifugação. Esta redução lipídica também foi auxiliada pela razão de água x massa de MP (v:m), onde estudos apontados por Nolsoe e Undeland (2009) apresentam que, quanto maior a relação de água x MP, mais efetiva foi a redução lipídica, porque a água é um solvente polar, o que facilita a retirada de lipídios neutros e polares.

Omana et al (2010) encontraram valores de redução lipídica de 49,7% na mesma faixa de pH 11,0, sendo que em pH 11,5, encontraram sua maior redução no total de 53,0%. Mamaghani (2010) encontrou valores de 17% para proteínas e 3,2% para lipídios em base úmida, os quais, comparando com os valores em base úmida do IPFB, se expõem valores de 8,7% e 1,3% para proteína e lipídios respectivamente neste estudo. Já Moraes (2008) obteve, em sua solubilização alcalina, teor proteico de 75% e de lipídios de 8,0% para CMS de frango.

As farinhas comerciais processadas com o subproduto deste estudo apresentaram-se com teores proteicos de 67 a 72%, não se apresentando significativamente diferentes entre si, porém diferentes estatisticamente tanto da MP quanto do IPFB. Comparando com IPFB,

este obteve um teor de proteínas superior em até 23,5%, demonstrando que o processo de variação do pH conseguiu um melhor rendimento na extração proteica em relação ao processo fabril de farinhas (cocção), sendo mais limpo e obtendo rendimentos e qualidade proteica melhor.

Quando se fala em lipídios, a diferença entre as farinhas e IPFB foi de até 55% de redução lipídica, o que representaria uma diminuição na utilização de antioxidantes pelo fato do IPFB conter menos lipídios suscetíveis de oxidação e comprovando que o processo de extração proposto neste trabalho possui uma maior efetividade na redução lipídica do que o processo fabril de farinhas.

Ao se observar a parte mineral (cinzas), o IPFB obteve teores reduzidos em até 83% de cinzas comparando com farinhas comerciais, além de este teor provir de minerais aderidos às proteínas e aos lipídios, sob a forma de pó, não causando possíveis danos ao animal na sua alimentação devido à presença de fragmentos ósseos nas rações.

O teste estatístico aplicado demonstrou que há diferença significativa entre MP, FA e IPFB nos teores de proteína, lipídios e matéria mineral. As FA não apresentaram diferenças significativa entre si para proteína e lipídios, apresentando-se diferente a amostra C ante amostra A e B para matéria mineral.

Índices como os de acidez, peróxidos e TBARS, apresentam uma relação de estado de qualidade da MP ou produto analisado quanto à estabilidade destes em relação aos seus ácidos graxos da composição ou ainda sobre a oxidação dos lipídios presentes na matriz. A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos para acidez, peróxidos e TBARS nas diferentes amostras analisadas (MP, farinhas e IPFB), analisadas estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 17 – Índices qualitativos da matéria-prima, das farinhas comerciais e do isolado proteico de frango obtido em bancada.

AMOSTRA*	Índice Acidez (meq/g Amostra)	Índice Peróxidos (meq/g Amostra)	TBARS (mg MAD/g Amostra)
MP	2,5±0,08 ^a	0,001±0,00 ^b	0,0001 ^e
A	2,0±0,08 ^c	0,049±0,00 ^a	0,128 ^a
B	1,6±0,04 ^d	0,002±0,00 ^b	0,041 ^d
C	1,9±0,09 ^c	0,003±0,00 ^b	0,089 ^b
IPFB	2,2±0,04 ^b	0,003±0,00 ^b	0,081 ^c

Onde: MP = matéria-prima; IPFB = isolado proteico de frango obtido em bancada.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

* Cada letra diferente (A, B, C), identifica fornecedor de farinha diferente.

O índice de acidez é uma informação relativa à estabilidade do material, sendo considerada de parâmetro de interesse comercial, a qual revela a disponibilidade de ácidos graxos livres em decorrência da ação da lipase e/ou autooxidação de lipídios presentes (COSTA, 2007). Os índices de acidez visualizados demonstram que houve uma leve redução em todos os produtos (farinhas e IPFB) em relação a MP. O pH é influente no índice de acidez, porém o teor proteico pode ter funcionado como tampão, impedindo uma variação maior na acidez do produto proteico obtido.

Estatisticamente a MP, farinha B e IPFB apresentaram diferença significativa no índice de acidez contra as demais amostras. As amostras das farinhas A e C se mostraram iguais. Pode-se afirmar que o processo de isolamento manteve as características de qualidade quanto ao índice de acidez, não desviando para incremento neste índice e posterior perda de qualidade do produto. O resultado obtido para IPFB demonstrou que não há alteração no índice de acidez pelo processo de variação do pH, estando o valor obtido para o isolado proteico dentro dos padrões de legislação para farinhas comerciais segundo Brasil (1988).

O índice de peróxidos apresenta o comportamento oxidativo dos lipídios presentes no material exposto, mensurando produtos primários da oxidação lipídica, sendo de maior valor onde há ácidos graxos insaturados, como normalmente nas farinhas comerciais. É um índice que apresenta três fases: iniciação (baixo índice de peróxidos); propagação (alto índice de peróxidos); e terminação (baixo índice de peróxidos), o que aparentemente pode trazer uma informação de falsa ausência de oxidação caso resultados obtidos se encontrarem nas pontas das três fases (baixos índices) (FERNANDES, 2011).

Ante os resultados, apenas a farinha da amostra A destacou-se negativamente, apresentando uma oxidação maior em relação aos demais produtos analisados e apresentando-se estatisticamente diferente das demais amostras, conseqüentemente demonstrando que a amostra A, a amostra C, a MP e o IPFB apresentaram-se iguais. Tais dados nos informam que o processo de variação do pH não traz alteração na oxidação lipídica, conforme afirmado por Nolsoe e Undeland (2009).

O cálculo das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é uma mensuração de maior precisão da oxidação lipídica por medirem compostos secundários da oxidação. Baseia-se na reação entre TBA e carbonilas dos compostos secundários da oxidação em meio ácido, formando coloração possível de leitura em espectrofotometria (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). Em farinhas comerciais, não é um índice utilizado como oficial pelas metodologias do Ministério da Agricultura do Brasil. Em isolados proteicos, alguns autores como Kristinsson e Demir (2003), Kristinsson et al (2005),

Kristinsson e Liang (2006), Undeland et al (2005) e Vareltzis e Undeland (2012) utilizaram esta metodologia para medir a estabilidade lipídica dos isolados proteicos obtidos e sua vida útil.

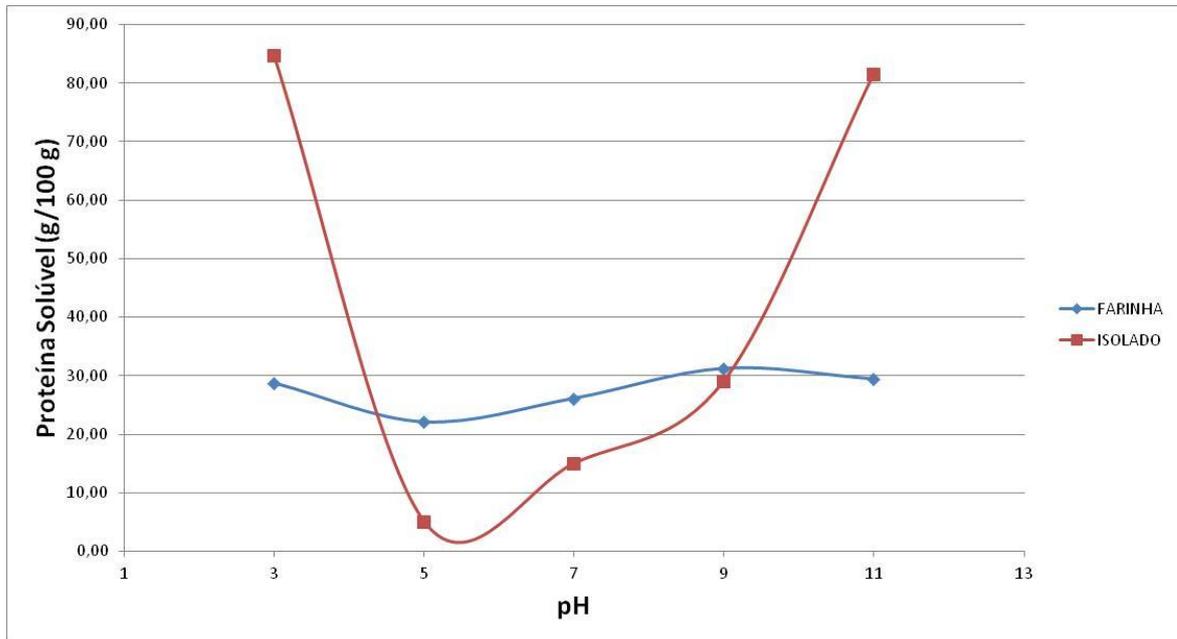
Os resultados obtidos para TBARS apontam o mesmo fenômeno que o obtido no índice de peróxidos, onde a farinha da amostra A apresentou-se com uma maior oxidação em relação às demais. Apenas a amostra C e o IPFB apresentaram-se iguais estatisticamente, porém diferentes das demais amostras. O resultado obtido para o IPFB comprova o que os autores citados anteriormente afirmam que o processo de isolamento proteico não altera significativamente a oxidação dos lipídios. Esta característica se torna importante fato de que um incremento de acidez ou peróxidos em rações animais pode causar estado de toxidez ao animal ao ingeri-las (SILVA et al, 2011).

Os dados expostos quanto aos índices de qualidade seriam explicados pela grande redução lipídica do IPFB obtido (redução de 76% em relação à MP). Estes dados de redução lipídica são esclarecedores quanto à necessidade da adição de antioxidantes ao IPFB obtido, o que pode ser demonstrado em outros estudos de avaliação da vida útil do IPFB. Todos os dados obtidos nas caracterizações físico-químicas e índices de qualidade apontaram um acréscimo nestas características para o IPFB, o que foi comprovado posteriormente nas avaliações funcionais e nutricionais da proteína obtida.

5.5.5 Avaliação funcional e nutricional

As proteínas cumprem papel importante nas características funcionais e sensoriais de diversos produtos alimentícios. O conhecimento de propriedades funcionais facilita a contribuição das proteínas nos mais diversos processos industriais como, por exemplo, a solubilidade é de vital importância na indústria de bebidas, bem como na indústria de rações. Nesta última, informações como solubilidade, CRA, CRO e digestibilidade são de grande valia para formular dietas específicas para ração animal (OLIVO, 2006). A Figura 11 apresenta o perfil de solubilidade obtido no IPFB e na farinha comercial da amostra A. A escolha desta amostra se deu pela que desempenhou o papel mediano entre as duas outras e pelo fato de se rodar analiticamente menor quantidade, diminuindo o consumo de reagentes neste trabalho.

Figura 11 – Curva de solubilidade para isolado proteico de frango obtido em bancada e farinha comercial da amostra A.



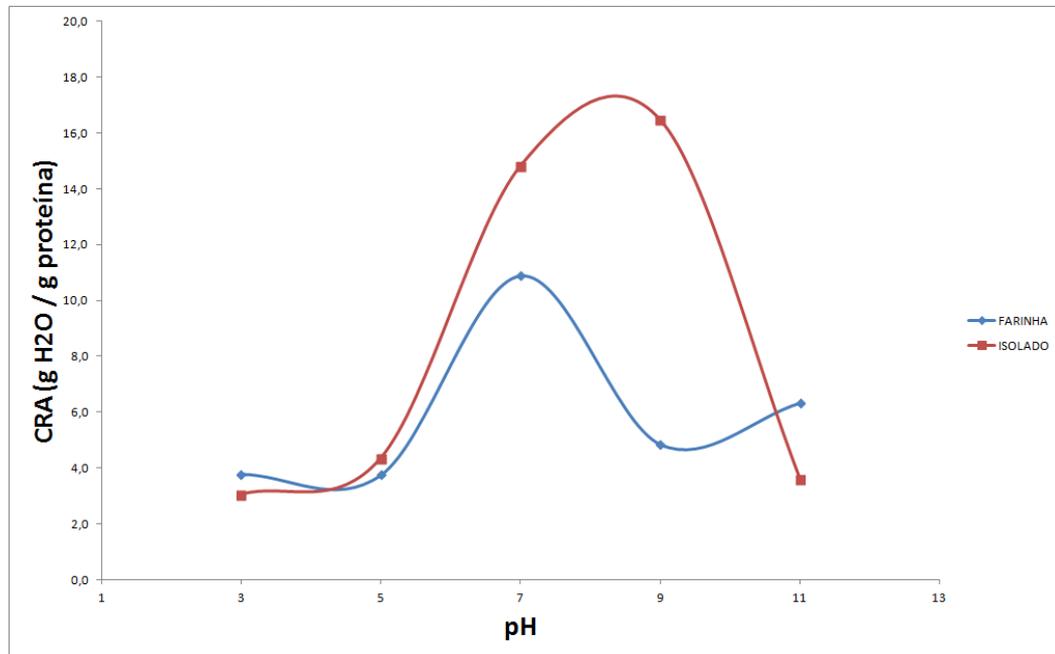
O comportamento da solubilidade apresentado na Figura 11 para o isolado proteico corresponde ao comportamento tipo U normal para proteínas nativas (OMANA et al, 2010) e, em comparação à Figura 8, apresentou o mesmo comportamento. Portanto pode-se afirmar que a proteína recuperada possui as mesmas características de solubilidade da proteína inicial (MP). O mesmo comportamento para obtenção de isolado proteico de coxas de frango foi obtido por Omana et al (2010). Os pontos de máxima solubilidade foram nos extremos (ácido e alcalino) e o ponto de menor solubilidade foi de pH 5,0 que é próximo ao pH isoeletrico utilizado no processo.

O comportamento para a farinha estudada apresenta uma linha de tendência de valores muito próximos, demonstrando o seu ponto isoeletrico na faixa de pH 5,0. As farinhas comerciais, como são obtidas por processos de cocção, passam por temperaturas bem acima dos 40 °C iniciais da desnaturação das proteínas. Damodaran, Parkin e Fennema (2010) definem que acima de 40 °C há um aumento da energia cinética térmica e esta ocasiona um desdobramento da proteína, chamada desnaturação. A desnaturação torna expostos grupos não polares internos da estrutura proteica, gerando uma agregação e precipitação, ou seja, diminuindo a solubilidade da proteína em meio aquoso.

A capacidade de retenção de água é importante em processos alimentícios, pois a água retida em pequenas quantidades não age como solventes, mas contribui para aumentar a massa e a viscosidade de produtos. A CRA em rações animais tem importância no que tange à capacidade da proteína aplicada absorver massa e solubilizar compostos adicionados

intencionalmente para melhoria do desempenho do animal no período de criação. A Figura 12 apresenta a curva de CRA para farinhas e IPFB.

Figura 12 – Capacidade de retenção de água apresentada para isolado proteico de frango obtido em bancada e farinha comercial da amostra A.



A curva de CRA obtida demonstra que em pH na faixa neutra e pouco alcalina (7,0 e 9,0) alcançam-se os maiores valores de retenção de água. Esta maior interação é devida ao fato das moléculas de água serem combinadas com os grupos polares das proteínas aumentando a CRA (FERREIRA et al, 2013). Nas faixas extremas e no pH próximo ao isoeletrico, a CRA é baixa em relação à faixa neutra. Rações com pH ácidos ou extremamente alcalinos não cumprirão um bom desempenho tanto na farinha comercial quanto no isolado proteico para reter água. Todos os pontos diferiram entre si estatisticamente ao aplicar o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A capacidade de retenção de óleo (CRO) é uma propriedade funcional importante para produção de rações. Ela permite a emulsificação das gorduras adicionadas ao produto, facilitando sua homogeneização e conseqüentemente sua extrusão sob a forma de pellets. Também garante que o lipídio adicionado à ração seja absorvido rapidamente pelo animal, pela sua ligação com a proteína da ração.

Já a digestibilidade da proteína assume um papel muito importante na avaliação nutricional de produtos para alimentação animal. Embora o conteúdo dos aminoácidos essenciais seja um indicador primário da qualidade nutricional, a verdadeira qualidade também depende do nível de utilização desses aminoácidos nos organismos (DAMODARAN,

PARKIN e FENNEMA, 2010). Olivo (2006) afirma que conhecer as exigências nutricionais dos animais, bem como a composição do alimento proposto e suas características nutricionais, é de extrema importância no processo de criação. A Tabela 18 apresenta os dados obtidos para CRO e digestibilidade das farinhas e IPFB, analisadas estatisticamente pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Tabela 18 – Digestibilidade proteica e capacidade de retenção de óleo obtido para isolado proteico de frango obtido em bancada e farinha comercial da amostra A.

Amostra	Digestibilidade (%)	CRO (mL óleo/g proteína)
Isolado	92,3±0,00 ^a	4,2±0,5 ^a
Farinha	84,8±0,01 ^b	2,6±0,5 ^b

Onde: CRO = capacidade de retenção de óleo.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste t ($p \leq 0,05$).

A CRO obtida demonstrou que o isolado tem uma maior capacidade de absorver óleos, facilitando os processos emulsificantes e por consequência a extrusão da ração. A baixa CRO por parte da farinha comercial pode ter sido ocasionada devido ao fato desta proteína estar desnaturada. As amostras apresentaram-se diferentes estatisticamente. Este dado mantém a presunção proposta deste trabalho de que a extração proteica pelo método de variação do pH tem maior eficiência proteica do que o processo convencional de farinhas comerciais. Freitas et al (2011) alcançaram valores de até 7 mL de óleo por grama de proteína em seu processo para obtenção de isolado de anchoita e Ferreira et al (2013) chegaram até 13 mL de óleo por grama de proteína na obtenção de seu isolado proteico de corvina, ambos pescados.

Os resultados obtidos para digestibilidade proteica demonstram bem a diferença entre os processos produtivos, onde IPFB atingiu 92% de coeficiente de digestibilidade proteica contra 84% obtido para farinha comercial. Conforme definido por Sgarbieri (1996), uma proteína desnaturada termicamente deveria melhorar a digestibilidade por facilitar ação proteolítica das enzimas. Porém, este efeito pode ser inverso, devido a alterações nas conformações e/ou interações da proteína causando um decréscimo da digestibilidade proteica. Isso é comprovado na Tabela 20, onde uma proteína nativa, que não sofreu processo de desnaturação térmica, apresentou valores de digestibilidade proteica maiores do que a proteína das farinhas comerciais, tratadas termicamente para sua obtenção.

Ferreira et al (2013) e Cortez-Vega et al (2013) encontraram valores de digestibilidade das proteínas de 91 e 94%, respectivamente, para corvina em seus estudos. Os isolados proteicos têm apresentado uma ótima funcionalidade para aplicação em diferentes alimentos (Gehring et al, 2011) e têm apresentado a quantidade suficiente de todos aminoácidos essenciais para cobrir a alimentação humana (Chen e Jaczynski, 2007; Marmon e

Undeland, 2010). Rostagno et al (2011) em suas tabelas brasileiras para aves e suínos apontam um coeficiente de 82% para farinha de vísceras de aves, o que condiz com o resultado obtido neste estudo.

Os dados de digestibilidade proteica nos trazem a comprovação da eficiência das proteínas obtidas pelo método de variação do pH, obtendo proteínas funcionais e nutricionais de melhor qualidade. O fato de a farinha de vísceras possuir maior teor de cinzas também é um indicativo da diferença obtida para menor de seu índice de digestibilidade da proteína.

Olivo (2006) descreve que o conceito de proteína ideal é definido como o balanceamento exato dos aminoácidos sem haver falta ou sobra, objetivando satisfazer as exigências de todos os aminoácidos para a manutenção e ganho de peso, reduzindo o uso destes como fonte de energia e diminuindo a excreção de nitrogênio por parte dos animais. O mesmo indica que a proposta, em nutrição, é que cada aminoácido essencial seja expresso em relação ou porcentagem a um aminoácido referência, possibilitando estimar rapidamente a exigência de todos os aminoácidos quando a exigência do aminoácido de referência estiver estabelecida. Ainda referencia a lisina como um aminoácido padrão para alimentação animal. Para tanto, se perfazem estudos dos perfis de aminoácidos das farinhas comerciais e insumos utilizados na produção de rações para animais. A Tabela 19 apresenta o perfil de aminoácidos obtido para IPFB e farinha comercial de subproduto de frango.

Tabela 19 – Perfil de aminoácidos para isolado proteico de frango obtido em bancada e farinha comercial da amostra A (em mg Aminoácido/g de proteína).

Aminoácido*	IPFB	Farinha
Ácido Aspártico – Asp	88,1±2,5 ^a	81,1±3,7 ^a
Ácido Glutâmico – Glu	138,6±4,2 ^a	131,7±1,7 ^a
Serina – Ser	38,3±3,9 ^a	39,7±0,1 ^a
Glicina – Gly	35,3±0,9 ^b	69,9±0,1 ^a
Histidina – His	29,9±0,5 ^a	23,8±0,2 ^a
Arginina – Arg	63,0±1,3 ^b	71,4±0,3 ^a
Treonina – Thr	45,8±2,5 ^a	43,2±1,1 ^a
Alanina – Ala	52,2±2,2 ^a	55,9±0,2 ^a
Prolina – Pro	47,5±2,7 ^b	63,1±3,0 ^a
Valina – Val	52,5±2,8 ^a	53,3±0,0 ^a
Metionina + Cisteína – Met+Cys	38,8±1,1 ^a	32,7±2,2 ^a
Isoleucina – Ile	51,8±3,5 ^a	47,0±0,3 ^a
Leucina – Leu	98,6±2,6 ^a	93,3±1,6 ^a
Fenilalanina + Tirosina – Phe+Tyr	93,7±1,2 ^a	91,6±1,4 ^a
Lisina - Lys	126,4±10,7 ^a	102,5±0,0 ^a

* Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si, pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Os perfis de aminoácidos obtidos para ambas as amostras apresentaram-se muito parecidos. Alguns aminoácidos como glicina, arginina e prolina destacam-se na farinha em

relação ao IPFB; e ácido aspártico, ácido glutâmico, histidina, metionina+cisteína, leucina e lisina destacam-se no IPFB em relação à farinha comercial. A não diferença significativa entre alguns aminoácidos explica-se fato de a matéria-prima ser basicamente a mesma; a diferença entre farinhas e IPFB é o conteúdo de vísceras que é processado juntamente nas farinhas.

Farinhas comerciais e IPFB não alcançaram a relação apresentada na Tabela 3 por Rostagno et al (2011) para os níveis de aminoácidos essenciais, porém se apresentam com uma boa fonte de aminoácidos, podendo ser utilizados como complemento nutricional para frangos de corte.

Já para o padrão estabelecido pela FAO (1985) e apresentado na Tabela 4, os índices são totalmente atendidos tanto por farinhas quanto pelo IPFB. Neste aspecto, em relação à produção de IPFB para alimentação humana, entra um paradigma ao qual é necessário um estudo mais aprofundado além de uma multidisciplinaridade de equipe para se definir se como um subproduto não comestível poderia se tornar comestível novamente? Tecnicamente, todos os estudos realizados anteriormente apresentam proteínas de boa qualidade funcional e nutricional, alguns aplicados a produtos alimentícios como: Fontana (2007) e Moraes et al (2011), aplicando em salsichas; Omana, Pietarski e Betti (2012), aplicando em mortadelas tipo Bolonha; Menezes (2014), aplicando isolados para obtenção de filmes nanocompósitos.

5.6 Influência de sais no processo de isolamento

A força iônica é uma característica influente na solubilização das proteínas (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). A adição de sais em baixa concentração influenciam no meio aumentando a capacidade de solubilização das proteínas em meio aquoso, que é o efeito chamado *salting-in*. O efeito contrário se dá quando da adição de altas concentrações salinas ao meio, efeito chamado *salting-out*. Para isto, foram testadas adições salinas de cloreto de sódio (NaCl) ao meio com o intuito de melhorar a solubilização ou precipitação das proteínas no processo variação do pH. A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos para adição de baixa concentração de NaCl.

Tabela 20 – Composição proximal do isolado proteico de frango adicionado de cloreto de sódio na solubilização das proteínas.

Componente (%)	0,25 M	0,5 M
	Média	Média
Umidade	-	-
Proteína	74,0±4,4	69,4±0,3
Lipídios	12,0±2,3	10,1±0,9
Matéria Mineral	10,3±0,1	18,7±0,2
Carboidratos*	3,7	1,8

Onde: MP = matéria-prima; IPFB = isolado proteico de frango obtido em bancada.

* Carboidratos calculados por diferença.

O rendimento de massa para este processo ficou em 9,1% no IPF salino 0,25 M, e 9,6% no IPF salino 0,5 M. Não houve um ganho de massa no processamento em comparação ao IPF obtido em bancada (rendimento de massa 16%), não apresentando nenhum ganho de processo comparado com o rendimento. A Tabela 20 apresenta-nos que, conforme adição de sais no meio aquoso houve o inverso do esperado da ação da força iônica, visto que a porcentagem de proteína dos isolados obtidos diminuiu em relação ao isolado de bancada padrão (84% em B.S.) e notou-se um incremento no teor de cinzas, o que não é um resultado satisfatório visto que se busca a purificação da proteína.

A Figura 14 apresenta os tubos de centrifugação após o processo de centrifugação II, com a pouca proteína precipitada no meio aquoso.

Figura 13 – Tubos contendo baixa proteína precipitada do isolado proteico de frango adicionado de cloreto de sódio na solubilização das proteínas.



Fonte: o autor.

Na avaliação realizada para *salting-out*, durante o processo não houve o efeito esperado no processo de aumento de precipitação e, sim, o efeito contrário mantendo as proteínas solubilizadas no meio. Este efeito pode ter ocorrido pela baixa concentração de sal no meio durante a precipitação, bem como pela mudança da faixa de pH para o ponto isoelétrico como é visualizado na Figura 3, onde para proteínas miofibrilares sem o ajuste na força iônica proposto pelo autor, o ponto isoelétrico ficou entre 5 e 6, sendo que para a mesma proteína com ajuste de força iônica, a faixa de pH ficou entre 4 e 4,5. Para este teste, deveria ser estudada a correlação exposta por Ruckenstein & Shulgin (2006) que apontam a equação de modelo de Cohn para o cálculo da molaridade necessária para a precipitação proteica por *salting-out*.

5.7 Planejamento experimental – centrifugação I

A capacidade do processo de variação do pH em remover grande parte dos lipídios é uma das grandes preocupações de estudo. Nolsoe e Undeland (2009) apresentam como principais fatores para melhor redução lipídica o conteúdo inicial de lipídios na MP, a viscosidade do meio após ajuste do pH e a velocidade de centrifugação utilizada no primeiro processo (centrifugação I). A remoção dos lipídios é importante devido a sua grande capacidade oxidativa, podendo ocasionar deterioro ao produto proteico final. Vareltsis e Undeland (2008) efetuaram um estudo, reduzindo a velocidade centrífuga de 8000 xg para 800 xg e encontraram um acréscimo no teor de lipídios de mais de 100%.

O planejamento experimental proposto foi delineado conforme o máximo de velocidade comportada pela centrífuga de piso refrigerada do LTA e o volume de seus tubos. Os dados do delineamento 2², suas variáveis dependentes e respostas encontram-se na Tabela 21. As respostas de proteína e lipídios mostram-se em base seca (B.S.).

Tabela 21 – Resultados obtidos na produção de isolado proteico de frango no delineamento 2² proposto.

Ensaio	Velocidade Centrífuga (VC)	Tempo de Centrifugação (TC)	Rendimento Proteico (%RP)	Proteína do Isolado (%PS)	Lipídio do Isolado (%LS)
1	-1	-1	54,6	70,7	29,0
2	+1	-1	60,2	81,1	17,4
3	-1	+1	43,5	74,8	24,4
4	+1	+1	46,3	84,2	15,9
5	-1,41	0	75,4	71,1	30,4
6	+1,41	0	90,3	89,6	9,8
7	0	-1,41	67,4	77,3	17,5
8	0	+1,41	75,3	81,8	12,4
9	0	0	88,6	85,4	11,6
10	0	0	92,2	84,4	11,3
11	0	0	72,7	87,2	11,0

Os resultados obtidos e apresentados na Tabela 21 demonstram que existe uma grande variação quando da alteração nas variáveis de velocidade centrífuga e tempo de centrifugação. Os valores de rendimento proteico (%RP) não foram estatisticamente correlacionados em relação às variáveis propostas, sendo que os maiores rendimentos propostos se obtiveram no ensaio 10 e no ensaio 6, sendo ambos diferentes, um ponto central e outro um ponto axial.

Estes ensaios foram os que apresentaram uma maior quantidade de massa de isolado proteico úmido (108,9 e 100 g, respectivamente) em uma variação total de massa entre todos os ensaios de 55 a 108 g, demonstrando que a variação da MP e a capacidade de emulsificação das gorduras podem influenciar no rendimento de extração, conforme descrito por Kristinsson e Demir (2003). Seguindo o estudo de delineamento, efetuam-se as avaliações estatísticas para geração de superfícies de resposta. A variável estudada %RP não obteve variação significativa estudando a influência das variáveis, portanto não foi gerada análise estatística e superfície de resposta para esta.

Em relação aos dados de caracterização físico-química (%PS e %LS), a melhor razão de estudo para que o produto isolado de proteínas mantenha sua qualidade e obtenha melhores teores de proteína é a de maior %PS e menor %LS. Isso se deu no ensaio 6, onde pode-se visualizar 89% de proteína e 9% de lipídios, obtendo o melhor desempenho, demonstrando que quanto maior a velocidade centrífuga (14308 xg), melhor a separação de fases no processo. Esta afirmação é confirmada observando-se os ensaios 1 e 5, onde os valores de velocidade centrífuga são os menores e os teores de %LS são os maiores do experimento. Os dados obtidos concordam com o exposto por Varelzis e Undeland (2008).

5.7.1 Delineamento fatorial composto

5.7.1.1 Proteína

Na continuação da análise estatística para delineamento experimental foi realizada a análise de influência das variáveis ante a resposta proteína com o auxílio do programa Statistica 5.0. Os valores obtidos para as variáveis que apresentaram influência a um $p < 0,05$ são demonstrados na Tabela 22, com resultado de $R^2 = 0,898$ para a análise percorrida.

Tabela 22 – Tabela de efeitos para proteína seca em função da velocidade de centrífuga e do tempo de centrifugação.

Fator	Efeito	Erro Padrão	Coefficiente	p valor
Média	0,856672	0,014151	0,856672	0,000000
VC Linear	0,115304	0,017357	0,057652	0,000292
VC Quadrática	-0,064652	0,020711	-0,032326	0,016807
TC Quadrática	-0,072981	0,020711	-0,036491	0,009679

Os dados de efeito apresentados demonstram a confirmação de que a velocidade centrífuga (VC) influenciou no processo de separação centrifugação I. Foi observado efeito positivo da média e de VC linear e negativo para VC quadrática e TC quadrática. Com isso, foi elaborada a equação de efeitos em função das variáveis propostas, conforme demonstrada na Equação 9.

$$\%PS = 0,856672 + 0,057652*VC - 0,032326*VC^2 - 0,036491*TC^2, \text{ onde:} \quad (9)$$

VC = Velocidade da Centrífuga, TC = Tempo de Centrifugação.

Para confirmação da significância do modelo proposto, uma análise de variância (ANOVA) foi realizada, testando as variáveis que causaram efeito na resposta estudada. Os valores para ANOVA estão expostos na Tabela 23, considerando $p < 0,05$ e obtendo um $R^2 = 0,898$ e $R = 0,95$.

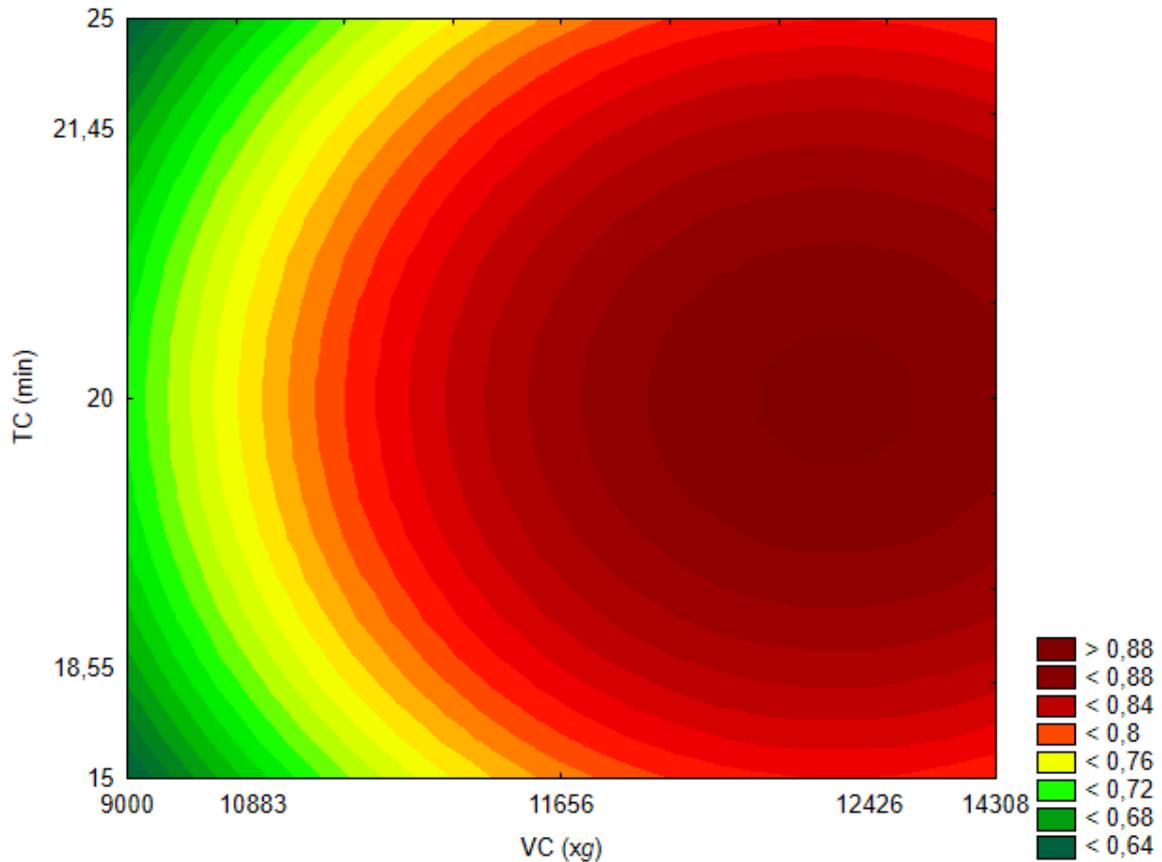
Tabela 23 – Verificação da validade estatística do modelo proposto na equação 9 para proteína seca.

Fator	SQ	GL	MQ	F_{calc}	F_{tabelado}
Regressão	0,036851	3	0,012284	14,61	4,35
Erro	0,004205	7	0,000841		
Total	0,041056	10			

Onde: SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média dos quadrados; F: Fisher.

Ao analisar a ANOVA, podemos visualizar que o modelo apresentado é significativo e preditivo para a variável %PS, permitindo predizer um modelo estatístico para esta variável, conforme já exposto na Equação 9. Através destes dados foram geradas superfícies de resposta e de contorno, como mostrado na Figura 14.

Figura 14 – Superfície de contorno da proteína seca em função do tempo de centrifugação (minutos) e da velocidade centrífuga (xg).



A superfície de contorno expõe o que foi visualizado na Tabela 21 em que os experimentos com velocidades centrífugas mais altas apresentaram melhor teor de proteína no isolado final. O modelo é significativo ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), correlacionado ($R = 0,95$) e preditivo ($F_{\text{calculado}} > 3 \times F_{\text{tabelado}}$). O ponto de melhor proteína seca está na faixa de velocidade de centrifugação de 12426 xg e o tempo não se mostrou muito influente nesta avaliação, sendo que 20 minutos se demonstraram suficientes para o processo (ponto central). DeWitt, Nabors e Kleinholz (2007) afirmam que os valores de melhor redução e, conseqüentemente, maior purificação das proteínas se dá quando se aplica velocidade centrífuga acima de 10000 xg.

5.7.1.1 Lipídios

Dando continuidade a análise estatística para delineamento experimental, foi realizada a análise de influência das variáveis ante a resposta lipídios com o auxílio do programa Statistica 5.0. Os valores obtidos para as variáveis que apresentaram influência a um $p < 0,05$ são demonstrados na Tabela 24, com resultado de $R^2 = 0,919$ para a análise percorrida.

Tabela 24 – Tabela de efeitos para lipídios base seca em função da velocidade centrífuga e do tempo de centrifugação.

Fator	Efeito	Erro Padrão	Coefficiente	p valor
Média	0,113056	0,001931	0,113056	0,000292
VC Linear	-0,123596	0,002369	-0,061798	0,000367
VC Quadrática	0,109367	0,002826	0,054683	0,000667
TC Linear	-0,033481	0,002369	-0,016740	0,004967
TC Quadrática	0,057004	0,002826	0,028502	0,002449
Interação VC x TC	0,015215	0,003345	0,007607	0,045080

Os dados de efeito apresentados demonstram a confirmação de que a velocidade centrífuga (VC) também influencia no processo de separação centrifugação I para a redução de lipídios no isolado final. Foi observado efeito positivo na média, VC quadrática, TC quadrática e interação entre VC e TC e negativo para VC linear e TC linear. Com isso, foi elaborada a equação de efeitos em função das variáveis propostas, conforme demonstrada na Equação 10.

$$\%LS = 0,113056 - 0,061798*VC + 0,054683*VC^2 - 0,016740*TC + 0,028502*TC^2 + 0,007607*(TC*VC), \text{ onde:} \quad (10)$$

VC = Velocidade da Centrífuga

TC = Tempo de Centrifugação.

Para confirmação da significância do modelo proposto, uma análise de variância (ANOVA) foi realizada, testando as variáveis que causaram efeito na resposta estudada. Os valores para ANOVA estão expostos na Tabela 25, considerando $p < 0,05$ e obtendo um $R^2 = 0,919$ e $R = 0,96$.

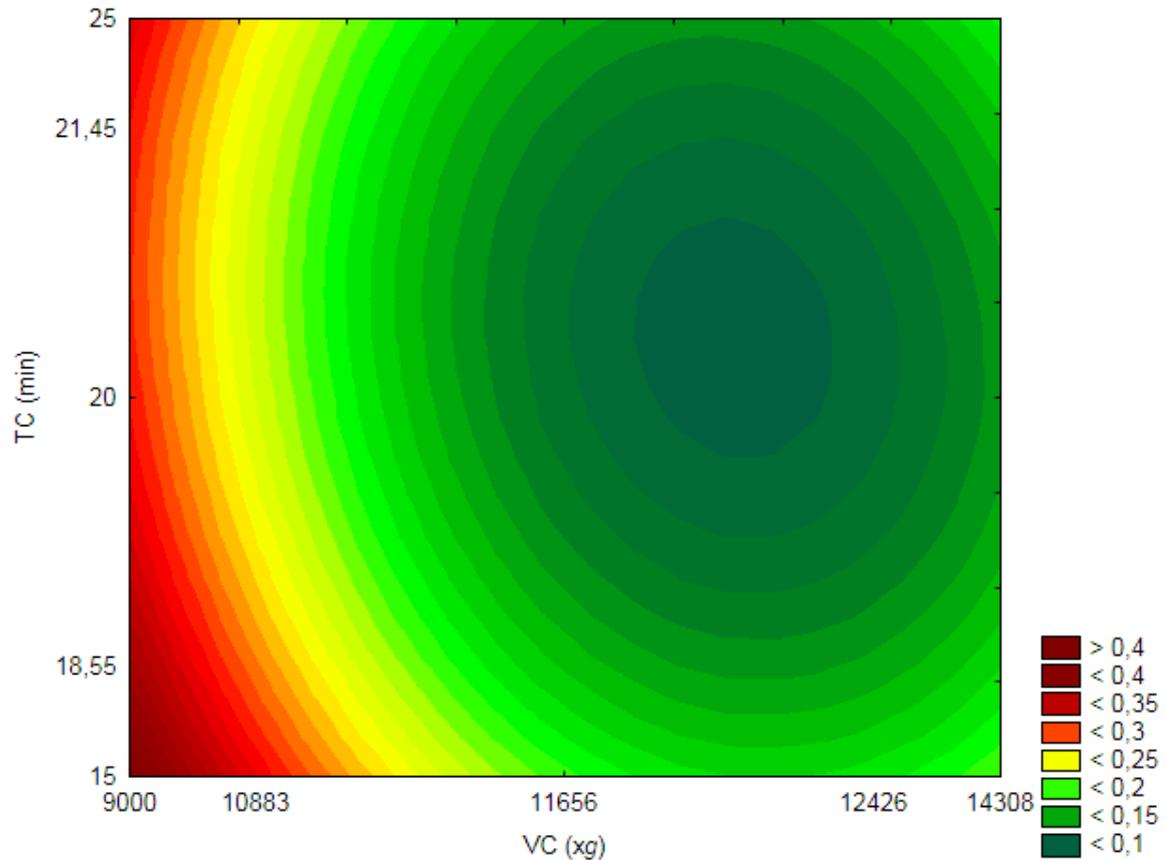
Tabela 25 – Verificação da validade estatística do modelo proposto na equação 10 para lipídios seca.

Fator	SS	DF	MS	F_{Calculado}	F_{Tabelado}
Regressão	0,050647	5	0,010129	11,35	5,05
Resíduos	0,004463	5	0,000893		
Total	0,055110	10			

Onde: SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média dos quadrados; F: Fisher.

Ao analisar a ANOVA, podemos visualizar que o modelo apresentado é significativo para a variável %PS, permitindo-nos prever um modelo estatístico para esta variável, conforme já exposto na Equação 10. Através destas respostas foram geradas superfícies de resposta e de contorno, conforme demonstrado na Figura 15.

Figura 15 – Superfície de contorno do lipídio seco em função do tempo de centrifugação (minutos) e da velocidade de centrifugação (xg).



A superfície de contorno expõe o que foi visualizado na Tabela 21 em que os experimentos com velocidades centrífugas mais altas apresentaram menor teor de lipídio no isolado final. O modelo proposto é significativo ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), preditivo ($F_{\text{calculado}} > 3 \times F_{\text{tabelado}}$) e correlacionado ($R=0,96$). O ponto de melhor resposta em lipídio em base seca está na faixa de velocidade de centrifugação de 12426 xg e o tempo não se mostrou muito influente nesta avaliação, sendo que 20 minutos se demonstraram suficientes para o processo (ponto central). Nolsoe e Undeland (2009) comentam que o processo de centrifugação trás o ponto crítico na remoção de lipídios. Os autores afirmam que reduzir a força g na primeira centrifugação reduz a remoção lipídica, especialmente nos processos de solubilização ácida.

5.8 Aumento de processo

Processos laboratoriais normalmente traduzem-se em respostas para as variáveis analisadas e propostas, porém um dos problemas no desenvolvimento e posterior aplicação de tecnologias é o *scale-up* ou escalamento com o intuito de definir processos industriais em escala. Tornar uma tecnologia disposta para indústria é crítico, pois comportamentos entre pequenas escalas e escalas maiores podem apresentar-se diferentes. Visando avaliar o comportamento do processo e do produto obtido, efetuou-se um escalamento de processo,

aumentando em quatro vezes o volume de massa do processo obtendo isolado proteico de frango em escala (IPFE). A Figura 16 apresenta o equipamento utilizado para aumento de escala do processo em reator de 10 litros com jaqueta.

Figura 16 – Equipamento utilizado para aumento de escala do processo de isolado proteico de frango.



Fonte: o autor.

O processo utilizado seguiu a metodologia definida para obtenção de IPFB, avaliando as respostas: rendimento de massa, rendimento proteico, análise físico-química, índices de qualidade e digestibilidade proteica.

Nos primeiros ensaios realizados, utilizou-se o mesmo pHmetro do processo de bancada, com eletrodos de 10 cm. Os rendimentos obtidos foram aquém do que o processo de bancada resultou, obtendo-se rendimentos de massa de apenas 3% em massa seca e de 30% no rendimento proteico seco. Alterou-se então o eletrodo do potenciômetro de bancada para um eletrodo com 27 cm útil, que teve maior alcance de eficiência na altura do reator. O novo

processo foi avaliado e o produto obtido mostra-se na Figura 18 bem como os dados de rendimento de massa e proteico mostram-se na Tabela 27.

Figura 17 – Isolados proteicos de subprodutos de frango obtidos em escala (A) e bancada (B).



Fonte: o autor.

Tabela 26 – Valores obtidos para rendimento de massa e proteico do isolado proteico obtido em escala.

Rendimento Massa BS	Massa MP Úmido (g)	Umidade MP (%)	Massa MP BS (g)	Massa IPF Úmido (g)	Umidade IPF (%)	Massa IPF BS (g)	Rendimento (%)
	2400,4	66,7	799,3	1072,5	88,3	125,5	15,7
Rendimento Proteico BS	Massa MP (g)	Proteína MP (%)	Massa Prot MP (g)	Massa IPF (g)	Proteína IPF (%)	Massa Prot IPF (g)	Rendimento (%)
	2400,4	49,8	1195,4	1072,5	85,0	911,7	76,3

Onde: MP = matéria-prima; IPF = isolado proteico de frango; Prot = proteína; BS = base seca.

Observando a Tabela 27, podemos verificar que não houve alteração nos valores obtidos para ambos os rendimentos, ao aumentar a escala do processo. A mudança para um eletrodo mais eficiente demonstra que o monitoramento e manutenção do pH do meio de solubilização é de vital importância no processo de extração por variação do pH.

5.8.1 Avaliação físico-química do isolado proteico

As respostas físico-químicas obtidas estão expostas na Tabela 27. Pode-se visualizar nela que o aumento de escala do processo apresentou-se semelhante perante o processo de bancada, provando que aumentar nessa escala não influenciou no rendimento e nas características físico-químicas do produto obtido. As respostas foram analisadas estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Estes dados comprovam a afirmação de que o controle de pH da solubilização das proteínas torna-se um ponto crítico no processo de extração. As respostas obtidas mantêm o ganho proteico e a redução lipídica em relação à MP do IPFB, além dos ganhos em relação à farinha comercialmente obtida.

Tabela 27 – Composição proximal da matéria-prima, isolado proteico de frango obtido em bancada e isolado proteico de frango obtido em escala.

Amostra*	Componente (g/100 g)**			
	Proteína	Lipídios	Matéria Mineral	Carboidratos***
MP	46,3±0,7 ^b	41,4±1,5 ^a	12,9±0,8 ^a	0,0
IPFB	84,5±3,3 ^a	9,7±1,8 ^b	2,5±1,0 ^b	3,3
IPFE	85,0±0,2 ^a	9,1±0,4 ^b	1,9±0,1 ^b	4,0

Onde: MP = matéria-prima; IPFB = isolado proteico de frango obtido em bancada; IPFE = isolado proteico de frango obtido em escala.

* Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

** Valores expressos em Base Seca.

*** Carboidratos calculados por diferença.

DeWitt, Nabors e Kleinholz (2007) aplicaram o processo de variação de pH com solubilização ácida e escala piloto em pescados e obtiveram uma redução lipídica de 74% do teor de lipídios inicial, concordando com os dados obtidos no aumento de escala realizado neste estudo, que alcançou uma redução lipídica de 78% porém utilizando solubilização alcalina. Tais autores utilizaram 10 kg de matéria-prima no processamento dentro da planta da indústria Proteus. Nolsoe e Undeland (2009) afirmam que o processo de variação do pH é propenso de ser realizado em aumento de escala, concordando com as informações demonstradas na Tabela 28.

A Tabela 28 mostra os resultados obtidos para os índices de acidez, de peróxidos e substâncias reativas ao TBA para MP, IPFB e IPFE, testadas estatisticamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 28 – Índices qualitativos da matéria-prima, isolado proteico de frango obtido em bancada e isolado proteico de frango obtido em escala.

AMOSTRA	Índice Acidez (meq/g Amostra)	Índice Peróxidos (meq/g Amostra)	TBARS (mg MAD/g Amostra)
MP	2,5±0,08 ^a	0,001±0,00 ^b	0,0001 ^c
IPFB	2,2±0,04 ^a	0,003±0,00 ^{a,b}	0,081 ^b
IPFE	3,1±0,07 ^a	0,005±0,00 ^a	0,214 ^a

Onde: MP = matéria-prima; IPFB = isolado proteico de frango em bancada; IPFE = isolado proteico de frango em escala. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As respostas dos índices de qualidade obtidas são apresentadas na Tabela 28. Pode-se visualizar na mesma que o aumento de escala do processo apresentou resultado semelhante ante o processo de bancada, provando que aumentar a escala nestas condições não influía nas características qualidade do produto obtido. Houve um acréscimo nos índices de acidez e de TBARS do IPFE. Este acréscimo pode ser indicado devido ao tempo de armazenamento da MP até a realização do estudo de aumento de escala, passando-se mais de 6 meses sob congelamento em freezer vertical à -18 °C.

DeWitt et al (2007) demonstraram que um aumento de escala utilizando solubilizações ácidas ou alcalinas em condições de baixa (3000 xg) ou alta (10000 xg) velocidade de centrifugação reduz significativamente os compostos odores/sabores a lama em catfish. Chen e Jaczynski (2007) estudaram processo contínuo para purificação de proteínas pela variação do pH, incluindo em seu processo as centrifugações com uma taxa de vazão de 120 L/h. Nos Estados Unidos, a indústria Proteus (www.proteusindustries.com) obteve sucesso na aplicação de processo industrial de purificação proteica utilizando o processo de variação do pH com solubilização ácida, produzindo isolados proteicos de músculo que são aplicados em produtos cárneos e empanados.

Torres et al (2007) propôs um sistema de reator contínuo para purificação de proteínas pelo processo de variação do pH. Uma vantagem do processo é o reciclo da água, porém esta causa um acúmulo de sais no processo o que altera as características de solubilização das proteínas afetando o ponto isoelétrico. Selmane, Christophe e Gholamreza (2010) purificaram proteínas de pulmões bovinos em escala laboratorial e escala piloto, obtendo resultados similares entre os estudos e com a literatura pesquisada pelos autores, reafirmando a resposta obtida neste estudo de similaridade de processos quando do aumento de escala.

Taskaya e Jaczynski (2009) aplicaram flocculantes comerciais para auxílio no processo de precipitação proteica, amparados pela lei clássica de Stoke, onde aumentando-se

o diâmetro da partícula de proteína aumenta num aumento na velocidade de sedimentação. Como resultado, os autores encontraram que flocculantes aniônicos aumentaram a separação das proteínas precipitadas, fato que conseqüentemente poderia facilitar o processo de aumento de escala. Salgado et al (2012) comprova os dados obtidos de escala laboratorial com um aumento de escala para obtenção de proteínas concentradas de girassol.

5.8.2 Avaliação nutricional do IPFE

Os dados obtidos para digestibilidade proteica são apresentados na Tabela 29 e testados estatisticamente por teste t ($p \leq 0,05$).

Tabela 29 – Digestibilidade proteica obtida para isolado proteico de frango obtido em bancada e isolado proteico de frango obtido em escala.

<u>Amostra</u>	<u>Digestibilidade (%)</u>
IPFB	92,3±0,00 ^a
IPFE	95,1±0,02 ^a

Onde: IPFB = isolado proteico de frango em bancada; IPFE = isolado proteico de frango em escala. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste t ($p \leq 0,05$).

A digestibilidade proteica manteve-se em níveis ótimos quando se efetuou o aumento de escala do processo. O produto obtido em escala alcançou 95% de digestibilidade proteica, valor acima do analisado para o isolado de bancada que atingiu 92%. Não houve diferença significativa nos valores obtidos, demonstrando que provavelmente não houve danos à qualidade nutricional da proteína ao aumentar a escala do processo.

6. CONCLUSÕES

A produção em bancada e o aumento de escala do processo de isolado proteico utilizando subprodutos não comestíveis da indústria de frango foram possíveis.

Os rendimentos do subproduto em relação à carcaça de frango foram compostos em percentuais em relação ao peso do animal vivo.

As farinhas comerciais foram analisadas quanto aspecto físico-químico e índices de qualidade, obtendo-se valores de até 72% de proteína, 22% de lipídios e 17% de matéria mineral, valores em base seca. Os índices de qualidade não apresentaram quaisquer desvios nas farinhas. Todos os valores obtidos estão condizentes com a legislação vigente.

Uma curva de solubilização das proteínas do subproduto utilizado como matéria-prima foi elaborada, determinando o ponto isoelétrico das proteínas para aplicação no processo de variação de pH na faixa de 5,25.

Em bancada, foi produzido isolado proteico de frango, alcançando teores proteicos de até 84% (incremento de 66% do teor em relação à matéria-prima); com redução lipídica de 76% e mineral de 85% em relação à matéria-prima. Em comparativo com as farinhas comerciais, o isolado apresentou um teor proteico 23,5% superior, uma redução lipídica de até 55% e mineral de até 83%. O isolado proteico de frango manteve as características de qualidade satisfatórias não apresentando desvios entre matéria-prima e farinhas comparadas. As propriedades funcionais e nutricionais foram avaliadas e os dados obtidos para o isolado proteico de frango apresentaram resultados de qualidade bastante significativa em relação à farinha, destacando-se a digestibilidade proteica que alcançou 92% de proteína disponível no isolado proteico assim obtido.

O processo de centrifugação I (após a solubilização proteica) foi estudado e elaboradas superfícies de resposta para teor de proteína seca e teor de lipídios seco em relação as variáveis velocidade e tempo de centrifugação. Foram dispostas regressões para as respostas em função das variáveis, provando que o processo é de vital significância para melhor qualidade do produto obtido.

O aumento de escala do processo proposto foi realizado, obtendo resultados similares com os dados obtidos para o processo em bancada, demonstrando que um aumento de escala é possível com o devido controle de pH no processo de solubilização das proteínas. Foram obtidos valores de até 85% de proteína, 9% de lipídios e 2% de cinzas para o isolado proteico de frango obtido em escala. Os índices de qualidade se mantiveram constantes no aumento de escala e a digestibilidade proteica obtida apresentou melhor índice, mas não significativo, em relação ao processo de bancada.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar os processos de redução de umidade possíveis para o produto isolado proteico obtido industrialmente;
- Avaliar o uso de compostos flocculantes adicionados no processo de precipitação isoeletrica, com o intuito de eliminar o mesmo o processo de centrifugação II, passando este a decantação;
- Aplicar os isolados proteicos em produtos alimentícios convencionais que utilizam proteínas de soja, a fim de avaliar as características de aplicação, textura, cor e outros;
- Utilizar ensaios biológicos com as proteínas obtidas para alimentação animal, a fim de avaliar a sua conversão alimentar.
- Avaliar qualidade microbiológica do isolado proteico obtido, comparando contra a qualidade microbiológica da matéria-prima e avaliando a vida útil quanto sua qualidade microbiológica;
- Produzir filmes utilizando o isolado proteico produzido com subprodutos de frango, testando suas características e aplicando a uma matriz alimentícia;
- Avaliar os aminoácidos obtidos em processo de hidrólise enzimática com possível aplicação como anti-hipertensivos e anti-microbiológicos;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRA – Associação Brasileira de Reciclagem Animal: **Diagnóstico técnico** – Disponível em: <http://abra.ind.br/views/download/diagnostico.pdf>. Acessado em 07/10/2013.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists International. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17 ed., Gaithersburg: AOAC, 2000.
- AWONORIN, S. O.; BAMIRO, F. O.; AYOADE, J. A.; OYEWOLE, L.O. Relationship of rendering process temperature and time to selected quality parameters of poultry by-product meal. **LTW – Food Science and Technology**. V. 28, Issue 1, p. 129-134, 1995.
- BARROS NETO, B. B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996, 299p.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los Alimentos**. 2ªed. Editora Acribia S.A., Zaragoza, Espanha, 1997.
- BELLAVER, C. **Limitações e vantagens do uso de farinhas de origem animal na alimentação de suínos e de aves**. 2º Simpósio Brasileiro Alltech da Indústria de Alimentação Animal. Curitiba, 28 a 30 de agosto de 2005.
- BERNARDI, F. **Uso do processo de compostagem no aproveitamento de resíduos de incubatórios e outros de origem agroindustrial**. 2011. 78 p. Dissertação (Mestrado Engenharia Agrícola). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel, 2011.
- BIDLINGMEYER, B. A., COHEN, S., TARVIN, T. L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **Journal of Chromatography**. Vol. 336. Pg.93-104. 1984.
- BIGELOW, C. C. On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. **Journal of Theoretical Biology**. V. 16, p. 187-211.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. V. 37, p. 911-917.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3ªed. São Paulo: Varela, 2003. 238p.
- BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. C.7, seção 1. Brasília, 1952.

- BRASIL. Portaria nº 7 de 09 de novembro de 1988 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF. Publicado em 14 de novembro de 1988, Seção 1, Página 21968.
- BRASIL. Portaria nº 108 de 04 de setembro de 1991. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF. Publicado em 17 de setembro de 1991, Seção 1, Página 19813.
- BRASIL. Manual de Procedimento Operacional Padrão para o Trânsito de Subprodutos de Origem Animal, Emissão de CIS-E e Credenciamento de Médicos Veterinários Particulares. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Esplanada dos Ministérios, Bloco D - 3º Andar, Brasília, DF. 2009.
- BRASIL. Aves. Artigo visualizado no website do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>, visualizado em 06/10/2013.
- BROWN, T.M.; CERRUTO-NOYA, C.A.; SCHRADER, K.K.; KLEINHOLZ, C.W.; DEWITT, M. Evaluation of a modified pH-shift process to reduce 2-methylisoborneol and geosmin in spiked catfish and produce a consumer acceptable fried catfish nugget-like product. **Journal of Food Science**. Vol. 77, nr. 10. P S377-S383. 2012.
- CASSEL, R. A.; ANTUNES, J. A. Jr.; OENNING, V.; Maximização da lucratividade em produção conjunta: um caso na indústria frigorífica. **Produção**. Vol. 16, nº 2. São Paulo, 2006.
- CHANG, B. H.; BAE, Y. C. Salting-out in the aqueous single-protein solution: the effect of shape factor. **Biophysical Chemistry**. V. 104, p. 523-533, 2003.
- CHEN, Y.C.; JACZYNSKI, J. Protein recovery from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing byproducts via isoelectric solubilization/precipitation and its gelation properties as affected by functional additives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 55, issue 22. P 9079-9088. 2007.
- CHEN, Y.C.; TOU, J.C.; JACZYNSKI, J. Amino acid and mineral composition of protein and other components and their recovery yields from whole Antarctic krill (*Euphausia superba*) using isoelectric solubilization/precipitation. **Journal of Food Science**. V. 74 issue 2. P H31-H39. 2009.
- CORTEZ-VEGA, W. R.; FREITAS, I. R.; PIZATO, S.; PRENTICE, C. Nutritional quality evaluation of Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) protein isolate. **Nutrition & Food Science**. V. 44, Nº 2, p. 134-144, 2013.

- COSTA, P. G. **Processo de extração química e potencial apresentado pela proteína recuperada da matriz dos exoesqueletos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*)**. 2003. 136p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2003.
- COSTA, D. S. C. **Aproveitamento de vísceras (não comestíveis) de aves para elaboração de farinha de carne: um perfil comparativo entre frango (*Gallus domesticus*) e ratitas avestrus (*Struthio camellus*) e ema (*Rhea americana*)**. 2007. 73p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2007.
- COSTA, D. P. S.; ROMANELLI, P. F.; TRABUCO, E. Aproveitamento de vísceras não comestíveis de aves para elaboração de farinha de carne. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28 (3), pg 746-752, 2008.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Ed. Porto Alegre, Brasil. 2010. 900p.
- DEWITT, M.; GOMEZ, C.A.; JAMES, J.M. Protein extraction from beef heart using acid solubilization. **Journal of Food Science**. Vol. 67. P 3335-3341. 2002.
- DEWITT, M.; KLEINHOLZ, C.W.; VANN, D.G.; BILBY, C.A.; THOMAS, S.; SCHRADER, K.K. Evaluation of acid and alkaline processing to remove muddy off-flavors in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**. Vol. 16, issue 2. P 77-90. 2007.
- DEWITT, M.; NABORS, R.L.; KLEINHOLZ, C.W. Pilot plant scale production of protein from catfish treated by acid solubilization/isoelectric precipitation. **Journal of Food Science**. Vol. 72, nr. 6. P E351-E355. 2007.
- DONATI, G.; PALUDETTO, R. Scale up of chemical reactors. **Catalysis Today**. Vol. 34, p 483-533. 1997.
- FAO/WHO/UNU. **Energy and protein requirements**. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation, Technical Report Series No. 724. Geneva. 1985.
- FAO. **Statistical yearbook, world food and agriculture**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Itália. 2013.
- FERNANDES, V. A. G. **Avaliação da qualidade da farinha de vísceras de aves de diferentes indústrias e épocas do ano**. 2011. 71 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2011.

- FERROLI, P. C. M.; NETO, M. F.; FILHO, N. C.; CASTRO, J. E. E. Fábrica de subprodutos de origem animal: a importância do balanceamento das cargas dos digestores de vísceras. **Produção**. V. 10, nº 2, p. 5-20, 2001.
- FERREIRA, F.A.; FREIRE, B.P.; DE SOUZA, J.T.A.; CORTEZ-VEGA, W.R.; PRENTICE, C. Evaluation of physicochemical and functional properties of protein recovered obtaining from whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) byproducts. **Food and Nutrition Sciences**. Vol. 4. P 580-585, 2013.
- FONKWE, L.G.; SINGH, R.K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**. V.31, p. 605-616, 1996.
- FONTANA, A. **Avaliação da textura apresentada por embutido emulsionado adicionado de isolado protéico úmido de corvina (*Micropogonias furnieri*)**. 2007. 98p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2007.
- FREITAS, I. R. **Recuperação das proteínas provenientes de pescado utilizando o processo de variação de pH**. 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.
- FREITAS, I. R.; GAUTÉRIO, G. V.; RIOS, D. G.; PRENTICE, C. Functionally of Protein Isolates from Argentine Anchovy (*Engraulis anchoita*) residue obtained using pH shift process. **Journal of Food Science and Engineering**. V. 1, p. 374-378, 2011.
- GEHRING, C.K.; GIGLIOTTI, J.C.; MORITZ, J.S.; TOU, J.C.; JACZYNSKI, J. Functional and nutritional characteristics of proteins and lipids recovered by isoelectric processing of fish by-products and low-value fish: A review. **Food Chemistry**. Vol. 124, p 422-431. 2011.
- GOMIDE, L.A.M.; RAMOS, E.M.; FONTES, P.R. **Ciência e qualidade da carne: série didática - fundamentos**. 1ª Edição. Viçosa, Brasil. 2013. 197 p.
- HAN, S-W.; CHEE, K-M; CHO, S-J. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. **Food Chemistry**. Vol 172, p 766-769. 2015.
- HUA, Y.; HUANG, Y.; QIU, A.; LIU, X. Properties of soy protein isolate prepared from aqueous alcohol washed soy flakes. **Food Research International**. V. 38, p. 273-279, 2005.
- HULTIN, H.O.; KELLEHER, S.D. **Process for isolating a protein composition from a muscle source and protein composition**. Advanced Protein Technologies Inc., US patente nº 6,005,073.

- HRYNETS, Y.; OMANA, D.A.; XU, Y.; BETTI, M. Comparative study on the effect of acid- and alkaline-aided extractions on mechanically separated turkey meat (MSTM): chemical characteristics of recovered proteins. **Process Biochemistry**. Vol. 46, p 335-343, 2011.
- ITAL – INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª Ed e 1ª Ed. Digital. São Paulo: Editora Adolfo Lutz, 2008.
- KAIN, R.J.; CHEN, Z.; SONDA, T.S.; ABU-KPAWOH. Study on the effects of control variables on the extraction of peanut protein isolates from peanut meal (*arachies hypogaea L.*). **American Journal of Food Technology**. V.4, p. 47-55, 2009.
- KHIARI, Z.; PIETRASIK, Z.; GAUDETTE, N.J.; BETTI, M. Poultry protein isolate prepared using acid solubilization/precipitation extraction influences the microstructure, the functionality and the consumer acceptability of a processed meat product. **Food Structure**. Vol 2, p 49-60. 2014.
- KRISTINSSON, H.G. **Conformational and functional changes of hemoglobin and myosin induced by pH: Functional role in fish quality**. Tese (Doutorado). Universidade Massachusetts, Estados Unidos. 2001.
- KRISTINSSON, H.G.; DEMIR, N. Functional fish protein ingredients from fish species of warm and temperate waters: comparison of acid- and alkali-aided processing vs. conventional surimi processing. **Advances in Seafood Byproducts**. P. 277-295. 2003.
- KRISTINSSON, H.G.; THEODORE, A.E.; DEMIR, N.; INGADOTTIR, B. A comparative study between acid- and alkali-aided processing and surimi for the recovery of proteins from channel catfish muscle. **Journal of Food Science**. Vol 70, issue 4, p C298-C306. 2005.
- KRISTINSSON, H.G.; LIANG, Y. Effect of pH-shift processing and surimi processing on Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*) muscle proteins. **Journal of Food Science**. Vol. 71, p 304-312. 2006.
- LAUFENBERG, G., Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, 87, pp.167-198. 2003.
- LEHNINGER, A.L. **Bioquímica**. 2ªed. São Paulo: Edgard Blücher, 1976.
- LEVIN, M. How to scale up scientifically. **Pharmaceutical Technology Scaling Up Manufacturing**. P. S4-S12. 2005.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265, 1951.

- MAMAGHANI, V. M. **Physicochemical and rheological properties of alkaline isolated poultry proteins**. 2010. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de Alberta, Canadá. 2010.
- MARMON, S.K.; UNDELAND, I. Protein isolation from gutted herring (*Clupea harengus*) using pH-Shift processes. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. Vol. 58, p. 10480-10486. 2010.
- MARMON, S.K.; UNDELAND, I. Effect of alkaline pH-Shift processing on *in vitro* gastrointestinal digestion of herring (*Clupea harengus*) fillets. **Food Chemistry**. Vol. 138, p. 214-219. 2013.
- MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; DAMODARAN, S.; PRENTICE, C. Chemical modification and Structural analysis of protein isolates to produce hydrogel using Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 165, p. 279-289, 2011.
- MELBOURNE, B.A.; CHESSON, P. Scaling up population dynamics: integrating theory and data. **Oecologia**. Vol. 145, p. 179-187. 2005.
- MENEZES, B.S. **Obtenção e avaliação de filmes nanocompósitos antimicrobianos com isolado proteico de frango e nanoargilas**. 2014. 85p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 2014.
- MEURER, R. W.; SANDLER, S. I.; LENHOFF, A. M. Salting-in characteristics of globular proteins. **Biophysical Chemistry**. V. 156, p. 72-78, 2011.
- MOLLER, J.; SCHROER, M. A.; ERLKAMP, M.; GROBELNY, S.; PAULUS, M.; TIEMEYER, S.; WIRKERT, F. L.; TOLAN, M.; WINTER, R. The effect of ionic strength, temperature, and pressure on the interaction potential of dense proteins solutions: from nonlinear pressure response to protein crystallization. **Biophysical Journal**. V. 102, p. 2641-2648, 2012.
- MORAES, K. S. **Recuperação e utilização de proteína da carne de frango por processo de mudança de pH**. 2009. 126p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.
- MORAES, K. S.; RAFAEL, R.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE, C. Influence of chicken protein isolate and heating temperature on textural properties of low-fat frankfurters. **Journal of Applied Poultry Research**. V. 20, p. 253-262, 2011.

- NIU, L.; RASCO, B.A.; TANG, J.; LAI, K.; HUANG, Y. Relationship of changes in quality attributes and protein solubility of ground beef under pasteurization conditions. **LWT – Food Science and Technology**. Vol. 61, p. 19-24. 2015.
- NOLSØE, H.; UNDELAND, I. The Acid and Alkaline Solubilization Process for the Isolation of Muscle Proteins: State of the Art. **Food Bioprocess Technology**. V. 1, p. 1-27, 2009.
- NUNES, V.N.; POZZA, P.C.; NUNES, C.G.V.; CAMPESTRINI, E.; KÜLH, R.; ROCHA, L.D.; COSTA, F.G.P. Valores energéticos de subprodutos de origem animal para aves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Volume 34, nº 4, p. 1217-1224, 2005.
- NUNES, A. J. P.; SÁ, M. V. C.; BROWDY, C. L. Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. **Aquaculture**. Vol. 431. P. 20-27. 2014.
- OMANA, D.A.; XU, Y.; MOAYEDI, V.; BETTI, M. Alkali-aided protein extraction from chicken dark meat: chemical and functional properties of recovered proteins. **Process Biochemistry**. Vol 45, p. 375-381. 2010.
- OMANA, D.A.; PIETRASIK, Z.; BETTI, M. Use of poultry protein isolate as a food ingredient: sensory and color characteristics of low-fat turkey bologna. **Journal of Food Science**. Vol. 77, nr. 7, p. S274-S280. 2012.
- ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005a. 1º volume.
- ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005b. 2º volume.
- OLIVO, R. **O Mundo do Frango – Cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma: Imprint, 2006. P. 567-578.
- PARDI, M. C.; SANTOS, I.F.; PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia: editora UFG, 2001, 623p.
- PARK, J.D.; JUNG, C.H.; KIM, J.S.; CHO, D.M.; CHO, M.S.; CHOI, Y.J. Surimi processing using acid and alkali solubilization of fish muscle protein. **Journal Korean Food Science and Nutrition**. Vol. 32, p. 400-405. 2003.
- PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**. Volume 2, issue 1. p. 118-127. 2007.
- PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; CRUZ, G. A. D. R.; MENDES, F. Q.; COSTA, N. M. B. Digestibilidade *in vitro* e *in vivo* de proteínas de alimentos: estudo comparativo. **Alimentos e Nutrição Araraquara**. V. 17, Nº 1, p. 13-23, 2006.

- PIVA, G.; MOSCHINI, M.; FIORENTINI, L.; MASOERO, F. Effect of temperature, pressure and alkaline treatments on meat meal quality. **Animal Feed Science and Technology**. V. 89, p. 59-68, 2001.
- REED, P.B. **Nutrition and applied science**. St. Paul: West Publishing, 1984, 747p.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3ª edição – Viçosa – UFV. 252 p. 2011.
- RUCKENSTEIN, E.; SHULGIN, I.L.; Effects of salts and organic additives on the solubility of proteins in aqueous solutions. **Advances in Colloid and Interface Science**. V. 123, Issue 126, p. 123-126, 2006.
- SABINO, H. F. N., FINZER, J. R. D. **Subprodutos no processamento de aves**. In: V Jornada Científica Faculdade Associadas de Uberaba, 2006, Uberaba. **Anais**. Disponível em: <http://www.fazu.br/hd2/jornada2006/ENGE/trabenge.pdf>. Acessado em 08/10/2013.
- SALGADO, P.R.; DRAGO, S.R.; ORTIZ, S.E.M.; PETRUCCELLI, S.; ANDRICH, O.; GONZÁLEZ, R.J.; MAURI, A.N. Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus L.*) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. **LWT – Food Science and Technology**. Vol. 45, p. 65-72. 2012.
- SCHMIDT, C. G. **Hidrólise enzimática das proteínas de carne de frango**. 2008. 130 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande. 2008.
- SELMANE, D.; CHRISTOPHE, V.; GHOLAMREZA, D. Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: influence of operating conditions on functional proteins. **Meat Science**. Vol. 70. P 640-647. 2008.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996.
- SILVA, E. P. **Avaliação nutricional de farinhas de vísceras de aves e a utilização em rações de frangos de corte**. 2009. 135 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2009.
- SILVA, E.P.; LIMA, M.B.; RABELLO, C.BV.; LUDKE, J.V.; ALBINO, L.F.T.; SAKOMURA, N.K. Aspectos nutricionais de farinhas de vísceras de aves e sua utilização em rações de frangos de corte. **Acta Veterinária Brasilica**, v. 5, p. 108-118, 2011.

- UBABEF – União Brasileira de Avicultura – **Relatório anual 2014** – disponível em <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf> - acessado em 11/02/2015.
- TADPITCHAYANGKOON, P.; PARK, J.W.; YONGSAWATDIGUL, J. Conformational changes and dynamic rheological properties of fish sarcoplasmic proteins treated at various pHs. **Food Chemistry**. vol. 121, p. 1046-1052. 2010.
- TAHERGORABI, R.; SIVANANDAN, L.; JACZYNSKI, J. Dynamic rheology and endothermic transitions of proteins recovered from chicken-meat processing by-products using isoelectric solubilization/precipitation and addition of TiO₂. **LTW – Food Science and Technology**. Vol. 46, p. 148-155. 2012.
- TAHERGORABI, R.; BEAMER, S.K.; MATAK, K.R.; JACZYNSKI, J. Isoelectric solubilization/precipitation as a means to recover protein isolate from striped bass (*Morone saxatilis*) and its physicochemical properties in a nutraceutical seafood product. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 60, p. 5979-5987. 2012.
- TASKAYA, L.; CHEN, Y.C.; BEAMER, S.; JACZYNSKI, J. Texture and colour properties of proteins recovered from whole gutted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) using isoelectric solubilization/precipitation. **Journal of the Science of Food Agriculture**. Vol. 89, issue 2, p. 349-358. 2009.
- TASKAYA, L.; JACZYNSKI, J. Flocculation-enhanced protein recovery from fish processing by-products by isoelectric solubilization/precipitation. **LTW – Food Science and Technology**. Vol. 42, p. 570-575. 2009.
- THIANSILAKUL, Y.; BENJAKUL, S.; SHAHIDI, F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). **Food Chemistry**, V.103, p. 1385-1394, 2007.
- TIMASHEFF, S. N.; ARAKAWA, T. Mechanism of protein precipitation and stabilization by co-solvents. **Journal of Crystal Growth**. V. 90, p. 39-46, 1988.
- TORNBERG, E. Effects of heat on meat proteins – implications on structure and quality of meat products. **Meat Science**. Vol. 70, p. 493-508. 2005.
- TORRES, J.A.; CHEN, Y.C.; RODRIGO-GARCIA, J.; JACZYNSKI, J. Recovery of by-products from seafood processing streams. **Maximising the value of marine by-products**. P. 65-90. 2007. CRC Press.
- UNDELAND, I.; HALL, G.; WENDIN, K.; GANGBY, I.; RUTGERSSON, A. Preventing lipid oxidation during recovery of functional proteins from herring (*Clupea harengus*)

- fillets by an acid solubilization process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 53, issue 14, p. 5625-5634. 2005.
- USYDUS, Z.; SZLINDER-RICHER, J.; ADAMCZYK, M. Protein quality and amino acid profiles of fish products available in Poland. **Food Chemistry**. vol. 112, p. 139-145. 2009.
- VARELTZIS, P.; UNDELAND, I. Removal of lipids and diarrhetic shellfish poisoning toxins from Blue Mussels (*Mytilus edulis*) during acid and alkaline isolation of proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol 56, p. 3675-3681. 2008.
- VARELTZIS, P.; UNDELAND, I. Protein isolation from blue mussels (*Mytilus edulis*) using acid and alkaline solubilisation technique – process characteristics and functionality of the isolates. **Journal of Science, Food Agricultural**. Vol. 92, p. 3055-3065. 2012.
- VILLALVA, M. M. H. **Modificação química para obtenção de um isolado proteico de soja com solubilidade semelhante à da caseína humana**. 2008. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2008.
- VILLAMONTE, G.; SIMONIN, H.; DURANTON, F.; CHÉRET, R.; DE LAMBALLERIE, M. Functionality of pork meat proteins: impact of sodium chloride and phosphates under high-pressure processing. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. V. 18, p. 15-23, 2013.
- VISAK, V. N.; LOPES, J. N. C.; VISAK, Z. P.; TRINDADE, J.; REBELO, L. P. N. Salting-out in Aqueous Solutions of Ionic Liquids and K_3PO_4 : Aqueous Biphasic Systems and Salt Precipitation. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 8, p. 736-748, 2007.
- VYNCKE, W. Direct determination of thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**. Vol. 72, issue 12. p 1084-1087, 1970.
- WANG, H.; WU, J.; BETTI, M. Chemical, rheological and surface morphologic characterization of spent hen proteins extracted by pH-Shift processing with or without the presence of cryoprotectants. **Food Chemistry**. Vol. 139, p. 710-719. 2013.
- WANG, T.; ZHANG, H.; WANG, L.; WANG, R.; CHEN, Z.; Mechanistic insights into solubilization of rice proteins isolates by freeze-milling combined with alkali pretreatment. **Food Chemistry**. Vol. 178, p. 82-88. 2015.