

EDWIN ELARD GARCIA ROJAS

**TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO APLICADAS AO
PROCESSAMENTO DE OVO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

EDWIN ELARD GARCIA ROJAS

**TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO APLICADAS AO
PROCESSAMENTO DO OVO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 02 de Julho do 2004

Prof. José Antonio Marques Pereira
(Conselheiro)

Prof. Luis Antonio Minim
(Conselheiro)

Prof. Javier Telis Romero

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva

Prof^a Jane Sélia dos Reis Coimbra
(Orientadora)

A todos aquellos que persisten en la brega
por transformar la realidad....Adelante!!

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pela acolhida.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo o auxílio financeiro

À professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela oportunidade, pela orientação, pelo apoio, pelo amizade e pela paciência.

Ao professor Luis Antonio Minim, pela valiosa contribuição como conselheiro, pelo ensinamento, pelo apoio e pela amizade.

Aos meus pais Santos Garcia e Isabel Rojas e aos meus irmãos Javier, Jorge e Evelyn, pelo carinho e pelo incentivo de seguir em frente.

A mia esposa Rosimeire, pelo amor e por seu companheirismo nestos anos de conquistas e derrotas.

Aos meus amigos Abraham Giraldo, Wilmer Luera, Milton Cano e Sérgio Saraiva, pelo apoio e pela amizade.

Aos colegas do LPS (Laboratório de Processos de Separação), Jackson, Meriane, Edgar, Armando, Everaldo, Isabele, Anderson, Carol, Rafael, Rita, Tarliane e Sandra pela amizade e pelo auxílio nas atividades desenvolvidas.

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

ÍNDICE

Resumo.....	viii
Abstract.....	x
Introdução geral.....	1
Objetivos.....	4
Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica	
1. Ovo.....	6
1.1 Composição físico-química do ovo.....	6
1.2. Clara.....	8
1.2.1. Ovalbumina.....	9
1.2.2. Ovotransferrina (Conalbumina).....	10
1.2.3. Ovomucóide.....	10
1.2.4. Ovomucina.....	11
1.2.5. Lisozima.....	11
1.2.6. Outras proteínas da clara.....	11
1.3. Gema.....	12
2. Identificação da qualidade do ovo.....	15
2.1. Grupos.....	15
2.2. Classes.....	16
2.3. Tipos.....	16
3. Valores nutricionais do ovo.....	17
3.1. Valor biológico das proteínas.....	17
3.2. Digestibilidade dos lipídios.....	18
3.3. Minerais e vitaminas.....	18
4. Propriedades funcionais do ovo nos alimentos.....	19
4.1. Coagulação e gelificação.....	19

4.2. Emulsificação.....	20
4.3. Poder espumante.....	21
4.4. Outras propriedades funcionais.....	22
5. Técnicas de separação das biomoléculas do ovo.....	22
6. Adsorção.....	23
6.1. Cromatografia por interação hidrofóbica (CIH).....	23
6.1.1 Fatores que afetam a CIH.....	24
6.1.2. Aplicações da CIH.....	26
7. Referências Bibliográficas.....	27
Capítulo 2 - Redução do teor de colesterol da gema de ovo utilizando pectina	
Resumo.....	36
1. Introdução.....	36
2. Material e métodos.....	38
2.1. Material.....	38
2.2. Processo extrativo.....	38
2.3. Estudos Preliminares.....	38
2.4. Delineamento experimental.....	39
2.5. Quantificação do colesterol.....	40
2.6. Quantificação das proteínas.....	40
2.7. Análise estatística.....	41
3. Resultados e discussão.....	42
3.1. Estudo preliminar.....	42
3.2. Redução do teor de colesterol.....	42
3.3. Redução do conteúdo protéico.....	47
3.4. Otimização do processo extrativo.....	49
4. Conclusões.....	51
5. Referências Bibliográficas.....	52
Capítulo 3 - Adsorção de colesterol do plasma da gema de ovo em um adsorvente hidrofóbico	
Resumo.....	56
1. Introdução.....	56

2. Material e métodos.....	58
2.1. Material.....	58
2.2. Obtenção do plasma da gema.....	58
2.3. Quantificação do teor de colesterol.....	59
2.4. Experimentos de adsorção.....	59
2.5. Remoção de colesterol do plasma.....	59
3. Resultados e discussão.....	60
3.1. Experimentos de adsorção.....	60
3.2. Redução do teor de colesterol do plasma.....	65
4. Conclusões.....	66
5. Referências Bibliográficas	68
 Capítulo 4 - Adsorção das proteínas da clara de ovo empregando cromatografia por interação hidrofóbica	
Resumo.....	73
1. Introdução.....	73
2. Material e métodos.....	75
2.1. Material.....	75
2.2. Quantificação das proteínas.....	75
2.3. Experimentos de adsorção.....	75
2.4. Modelagem dos dados de equilíbrio.....	76
2.5. Cinética de adsorção.....	76
2.6. Modelo de transferência de massa.....	77
3. Resultados e discussão.....	78
3.1. Equilíbrio de adsorção.....	78
3.2. Modelagem dos dados de equilíbrio de adsorção.....	85
3.3. Cinética de adsorção.....	85
4. Conclusões.....	90
5. Referências Bibliográficas.....	92

RESUMO

ROJAS, Edwin Elard Garcia, D. S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2004.

Técnicas de separação aplicadas ao processamento de ovo. Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Conselheiros: Luis Antonio Minim e José Antônio Marques Pereira.

Neste trabalho foi avaliado o uso de adsorventes com características hidrofóbicas para a redução do teor de colesterol presente na gema e no plasma da gema de ovo bem como na adsorção das proteínas lisozima, conalbumina e ovalbumina da clara. O gel de pectina de alto teor de grupos metoxila foi um dos tipos de adsorvente empregado na redução de teor de colesterol da gema de ovo líquida *in natura*. Os experimentos com gel de pectina foram planejados utilizando a metodologia de superfície de resposta, com vistas a definir o nível de máxima extração de colesterol para um mínimo decréscimo do conteúdo protéico da gema. Foi observada, na gema, uma redução de 85,6% no teor de colesterol e uma queda de 11,4% no conteúdo protéico. A resina Streamline Phenyl[®] foi o outro tipo de adsorvente usado no estudo da redução do teor de colesterol presente no plasma da gema. Para tanto foram obtidos dados de equilíbrio de adsorção hidrofóbica do colesterol em tanques agitados à $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Observou-se que o aumento da concentração de sal (NaCl e Na₂SO₄) no sistema reduziu a extração de colesterol pela resina. Também foi constatado a redução de 70% do teor de colesterol com o uso de uma relação de diluição plasma:água de 1:4. Essa mesma resina foi empregada na adsorção hidrofóbica das proteínas da clara do ovo lisozima, conalbumina e ovalbumina, em tanques agitados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Verificou-se o aumento da retenção das proteínas com a elevação da concentração de sal nos sistemas. Entre os diferentes tipos de sais estudados (NaCl, Na₂SO₄ e (NH₄)₂SO₄) foi observada uma maior extração das proteínas com o uso de Na₂SO₄, indicando assim que este tipo de sal apresentou maior interação com as proteínas avaliadas, embora cada tipo de sal interaja em

grau diferenciado com cada uma das proteínas. O modelo de transferência de massa empregado simulou corretamente o comportamento da cinética de adsorção das proteínas nas condições estudadas.

ABSTRACT

ROJAS, Edwin Elard Garcia, D. S., Universidade Federal de Viçosa, July of 2004.

SEPARATION TECHNIQUES APPLIED TO THE EGG PROCESSING. Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Committee members: Luis Antonio Minim and José Antônio Marques Pereira.

Hydrophobic adsorbents were used to evaluate the cholesterol content reduction in egg yolk and plasma of egg yolk, and also the purification of egg white proteins lysozyme, conalbumin and ovalbumin. The gel of high methoxyl pectin was one kind of adsorbent tested aiming the reduction of the liquid egg yolk cholesterol. The response surface methodology was applied to define the level of maximum yolk cholesterol removal at a minimum yolk protein extraction. The optimal values were of 85,6% for the cholesterol content reduction and of 11,4% for the protein content decrease. The Streamline Phenyl® resin was the other kind of hydrophobic adsorbent evaluated in the cholesterol reduction of the plasma of egg yolk. Equilibrium data of cholesterol hydrophobic batch adsorption were determined at room temperature (25 ± 2 °C). The increase of the salt (NaCl and Na₂SO₄) concentration led to the decrease of the plasma yolk cholesterol adsorption and the increase of the plasma dilution increased the cholesterol extraction. A plasma:water dilution of 1:4 reduced 70% of the plasma cholesterol content. The Streamline Phenyl® resin was also used in the hydrophobic batch adsorption of the egg white proteins lysozyme, conalbumin and ovalbumin, at 25 ± 2 °C. It was observed the increase of the protein adsorption on the

increase of salt (NaCl , Na_2SO_4 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) concentration. The model of mass transfer used was appropriate to simulate the kinetics of adsorption of the studied proteins.

INTRODUÇÃO GERAL

A indústria de ovos tem por base o processamento de ovos de galinha (*Gallus domesticus*), usados na dieta da população desde a antiguidade, podendo afirmar que nenhum outro alimento de origem animal é mais consumido que esse em todo o mundo. Tal fato se deve à elevada qualidade nutricional de seus componentes, como proteínas de alto valor biológico, aminoácidos essenciais, lipídios facilmente assimiláveis, ácidos graxos insaturados, vitaminas e sais minerais como fósforo e ferro (SANTOS, 2000; SURAI, 2001; LINDEN e LORIET, 1996). É também um alimento de baixo custo, acessível a todas as camadas da população e com elevada capacidade de produção. Em 2001, o Brasil ocupou a sétima posição na produção mundial de ovos, com 2,82% do total produzido (FAO, 2004). A safra brasileira de ovos brancos e vermelhos em maio de 2004 alcançou 3,539 milhões de caixas com 30 dúzias (AVES e OVOS, 2004).

O peso médio dos ovos de diferentes raças de galinhas é de 60 g. São constituídos de casca (8 a 11%), clara (56 a 61%) e gema (27 a 32%) (FENEMA, 1993).

A clara é uma fonte natural de proteínas de reconhecidos potenciais nutricional, biológico e de interesse tecnológico (AWADE et al., 1994; CROGUENNEC et al., 2000). Três proteínas de particular importância presentes na clara são a lisozima, conalbumina e ovalbumina. A lisozima (3,5% do total de proteínas da clara) tem propriedades antibactericidas e é usada amplamente na preservação de alimentos e na indústria farmacêutica. A conalbumina (13% do total de proteínas da clara) é uma glicoproteína com atuação no transporte do ferro e de ampla atividade antimicrobiana. A ovalbumina (54% do

total de proteínas da clara) é uma glicoproteína com propriedades de coagulação e gelificação (VACCHIER et al., 1995).

Os lipídios e as proteínas são os maiores constituintes da gema. Ambas as frações tem uma importância particular no processamento da indústria de alimentos, na formulação de cosméticos e como componentes bioativos da indústria farmacêutica (KWAN et al., 1991; CARRILLO e KOKINI, 1988). A gema de ovo consiste de um plasma solúvel (em torno de 78% do total líquido da gema) composto por livetinas e lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A fração LDL contém cerca de 12% de proteínas e aproximadamente 80% de lipídios, compostos por 70% de lipídios neutros, 26% de fosfolipídios e 4% de colesterol livre. Adicionalmente, é considerada responsável pelas propriedades emulsificantes da gema por conter os complexos proteína-fosfolipídios (lipoproteínas) (MINE e BERGOUGNOUX, 1998).

As propriedades funcionais atribuídas aos ovos, como coagulação, emulsificação e formação de espumas, tornam-nos um ingrediente indispensável no preparo de diferentes tipos de alimentos processados, como maioneses, molhos para saladas, massas, produtos de padaria e sorvetes (STADELMAN e COTTILL, 1995; LINDEN e LORIET, 1996). No entanto, o crescimento do consumo de ovos não alcança todo o seu potencial em decorrência de possíveis consequências danosas à saúde, oriundas da ingestão da elevada quantidade de colesterol contido na gema, entre 180 a 250 mg de colesterol por gema (ELSWYK et al., 1991; MCNAMARA, 1987). O colesterol, quando exposto ao ar e a temperatura ambiente, é suscetível à oxidação, podendo gerar mais de 60 diferentes subprodutos, os chamados óxidos de colesterol (RAZZAZI-FAZELI et al., 2000). Estudos toxicológicos têm mostrado que os óxidos de colesterol exercem ações mutagênicas, citogênicas e carcinogênicas, estando envolvidos na iniciação e propagação de várias doenças, como câncer, aterosclerose e distúrbios cardiovasculares (MISSLER, 1985; JOHNSON, 1996).

Os problemas relacionados com o alto teor de colesterol em alimentos, como ovos e seus derivados, têm estimulado o aparecimento de novas tecnologias para reduzir sua concentração ou eliminá-lo desses alimentos. Essas propostas incluem alterações na alimentação das aves, a fim de induzir mudanças na composição da gema (BURLEY e

VADEHRA, 1989); extração do colesterol com solventes orgânicos (CHUNG e FERRIER, 1991, BORGES, 1995); com fluido supercrítico (FRONING et al., 1990); complexação do colesterol, empregando-se beta-ciclodextrinas (SHUKLA, 1991) e a sua transformação em produtos não tóxicos pela ação de enzimas (WATANABE et al., 1986). Entretanto, o uso desses métodos apresenta inconvenientes, como altos custos de instalação e operação ou baixa seletividade ou remoção de aromas e outros nutrientes. Diante dessas limitações, uma técnica com potencial de adequação à extração do colesterol da gema é a adsorção, na qual certos componentes de uma fase fluída são transferidos para a superfície de um adsorvente sólido, em um fenômeno de superfície. A adsorção (troca iônica) foi aplicada, em escala de laboratório, para purificação das proteínas da clara de ovo por AWADE et al. (1994), CROGUENNEC et al. (2000), LEVISON et al. (1992) e VACCHIER et al. (1995). Segundo VACCHIER et al. (1995), essas proteínas também foram separadas usando a precipitação com sais ou solventes, mas apresentaram desvantagens como a desnaturação e baixa pureza das proteínas, evidenciando, assim, a adequabilidade da cromatografia líquida à purificação dessas proteínas.

O poder de fracionamento dos métodos cromatográficos por adsorção (tanque agitado, leito fixo, leito fluidizado) transforma-os em uma técnica atrativa de separação molecular, macromolecular e de eliminação de substâncias contaminantes dos bioprodutos a purificar (LYDDIATT, 2002). A escolha da técnica cromatográfica para efetuar dada separação dependerá de certas propriedades biológicas e físico-químicas dos compostos de interesse como carga líquida (cromatografia de troca iônica), características bioespecíficas (cromatografia por bioafinidade) e hidrofóbicas (cromatografia por interação hidrofóbica), entre outras.

A cromatografia por interação hidrofóbica (CIH) é fundamentada nas interações entre ligantes hidrofóbicos imobilizados na fase estacionária com as regiões apolares das biomoléculas. Durante os últimos anos, a CIH tem-se mostrado uma técnica de separação de proteínas estável e poderosa tanto em escala de laboratório quanto em nível industrial. O desenvolvimento de diferentes fases estacionárias para CIH tem fomentado sua aplicação na purificação de proteínas do soro humano, hormônios, proteínas recombinantes e enzimas (HRKAL e REJNKOVA, 1982; QUEIROZ et al., 1996, 2001).

Assim, visando agregar valor ao ovo, com a obtenção de seus derivados com elevados níveis funcionais e nutricionais, foi avaliado, neste trabalho, o emprego da adsorção com interação hidrofóbica no fracionamento de biomoléculas do ovo.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram avaliar:

- O emprego de pectina de alta metoxilação visando reduzir o teor de colesterol da gema de ovo. Buscou-se, também, minimizar o arraste das proteínas durante a extração.
- A adsorção em tanques agitados do colesterol presente no plasma da gema de ovo empregando-se uma resina de característica hidrofóbica ao variar o tipo e a concentração de sal, à temperatura ambiente.
- A adsorção em tanques agitados das proteínas da clara, lisozima, conalbumina e ovalbumina, utilizando-se uma resina de característica hidrofóbica em diferentes concentrações e tipos de sais, à temperatura ambiente.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Ovo

Segundo a Secretaria de Inspeção de Produto Animal (SIPA, 1990) do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a designação “ovo” refere-se ao ovo de galinha em casca, composto por gema, clara, membranas testáceas (interna e externa) e casca, tal como se pode observar na Figura 1. A gema encontra-se firmemente situada na posição central de um gel denso, que constitui a clara, pela ação da chalaza. A clara mantém-se firme na sua posição, por estar unida às membranas interiores da casca do ovo (ROBINSON, 1991). As quantidades relativas de cada fração são variáveis, mas se considera que os teores médios estejam entre 56 e 61% de clara, 27 e 32% de gema e 8 e 11% de casca (FENNEMA, 1993).

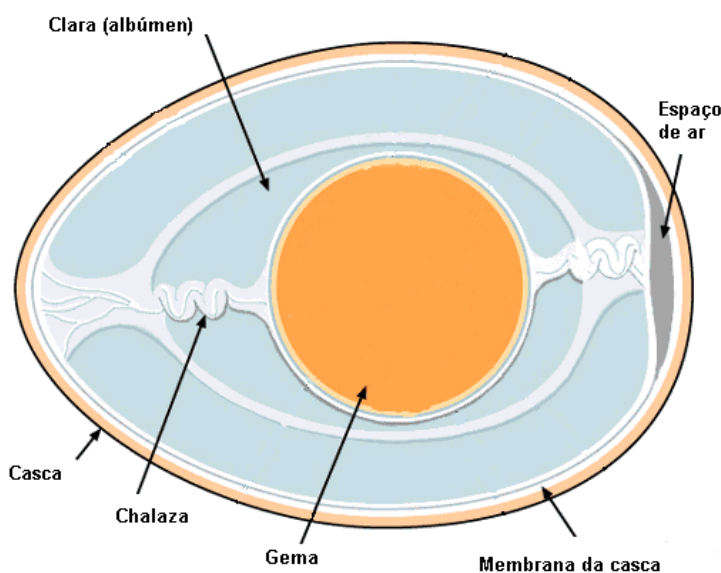


Figura 1 - Estrutura e composição do ovo

1.1. Composição físico-química do ovo

Na Tabela 1, observa-se que o componente majoritário dos sólidos na clara são as proteínas (9,7 a 10,6%). O conteúdo lipídico da clara é insignificante quando comparado com o da gema. Segundo ROMANOFF e ROMANOFF (1949), a quantidade de carboidratos livres, geralmente representados pela glicose, é de 0,4%.

A composição mineral da clara, como visto na Tabela 2, é extremamente variável, e, dentre os cátions mais abundantes, o sódio e o potássio ocupam uma posição de destaque (STADELMAN e COTTERILL, 1995; FENNEMA, 1993).

Já os componentes presentes na gema em maior quantidade (Tabela 2) são as proteínas (15,7 a 16,6%) e os lipídios (31,8 a 35,5%). O conteúdo de carboidratos em estado livre é de 0,2% aproximadamente. Os carboidratos unidos a proteínas são polissacarídeos de manoseglucosamina. Os elementos minerais mais abundantes da gema são o cálcio, potássio e fósforo.

Tabela 1 - Composição química do ovo

Componente	Proteína (%)	Lipídios (%)	Carboidratos (%)	Cinzas (%)	Água (%)
Ovo integral	12,8-16,4	10,5-11,8	0,3-1,0	0,8-0,1	74,6
Gema	15,7-16,6	31,8-35,5	0,2-1,0	1,1	48,8
Clara	9,7-10,6	0,03	0,4-0,9	0,5-0,6	88,0
Casca	4,0	-	-	95	1,0

Fonte: Fennema (1993)

Tabela 2 - Composição da clara e da gema

Elemento	Clara (%)	gema(%)
Enxofre	0,195	0,016
Potássio	0,145-0,167	0,112-0,360
Sódio	0,161-0,169	0,070-0,093
Fósforo	0,018	0,543-0,980
Cálcio	0,008-0,02	0,121-0,262
Magnésio	0,009	0,032-0,128
Ferro	0,0009	0,0053-0,011

Fonte: Li-Chan et al. (1995)

A casca do ovo é composta por uma matriz de fibras entrelaçadas de natureza protéica, por cristais de calcita (carbonato de cálcio) em uma proporção de 1:50 e por uma cutícula de natureza protéica, que cobre a sua superfície (POWRIE e NAKAI, 1993). Os elementos minerais presentes na casca são o cálcio (98%), magnésio (0,9%) e fósforo (0,9%) (ROMANOFF e ROMANOFF, 1949).

Alguns dados de propriedades físico-químicas de ovos e seus derivados são apresentados na Tabela 3. Essas propriedades são necessárias para o projeto de processos que envolvem derivados de ovos e operações unitárias de pasteurização, congelamento e refrigeração, por exemplo.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas do ovo, da clara e da gema

Propriedade	Ovo integral	Clara	Gema
Sólidos (%)	26,4	11,5	52,5
pH		7,6	6,0
Densidade (kg · m ⁻³)	1080	1033	1131
Ponto de congelamento (°C)		-0,42	-0,57
Calor específico (kJ · kg ⁻¹ · K ⁻¹)	3,23	2,68	3,54
Condutividade térmica (W · m ⁻¹ · K ⁻¹)		0,55	0,39
Viscosidade aparente (mPa·s)			
Clara concentrada		164	
Clara diluída		4	
Conductividade elétrica (mS · m ⁻¹)		82,5	0,7
Atividade de água		0,978	0,981

Fonte: ASHARE (1994) e Telis-Romero et al. (2004).

1.2. Clara

A clara de ovo é rica em água, e, entre os 12% de sólidos presentes na clara, as proteínas são seus principais componentes. A clara pode ser considerada um sistema

protéico composto de fibras de ovomucina e de uma solução coloidal de várias proteínas globulares (ASHARE, 1994). A ovalbumina, a conalbumina ou ovotransferrina e a ovomucóide são três glicoproteínas que representam mais de 80% da proteína total (LINDEN e LORIENT, 1996). A clara contém outras proteínas em menor quantidade, como pode ser observado na Tabela 4, e também apresentam propriedades funcionais e nutricionais importantes (CHARLEY, 1982; KORHONEN et al., 1998).

Tabela 4 - Proteínas da clara de ovo

Proteína	Extrato Seco (%)	Massa Molar (kDa)	Ponto Isoelétrico	Resíduos de Amino-ácidos	Hidrofobicidade (cal/res)	Temp. de Desnaturação (°C)
Ovalbumina	54	46	4,6	385	1.110	84,0
Conalbumina	12	76	6,5	-	1.080	61,0
Ovomucóide	11	28	4,0	185	920	70,0
Ovoglobulina	4	36	5,6	-	-	92,5
Lisozima	3,5	14,3	10,5	129	970	75,0
Ovomucina	3	5,5 x 10 ³	4,5 - 5,0	-	-	-
Ovoinibidor	1,5	49	5,1	-	-	-
Ovoglicoproteína	1,0	24,4	3,9	-	-	-
Ovoflavoproteína	0,8	34	4,0	-	-	-
Ovomacroglobulina	0,5	770	4,5	-	-	-
Ficíneo inibidor	0,05	12,7	5,1	-	-	-
Avidina	0,05	68,3	10	512	1,060	-

Fonte: Fennema (1993) e Lindet e Loriet (1996).

1.2.1 Ovalbumina

É a proteína predominante na clara de ovo. Foi obtida na forma cristalina pela primeira vez em 1889, por Hofmeister. É classificada como uma fosfoglicoproteína por possuir carboidratos e fosfatos ligados ao polipeptídeo. A ovalbumina representa 54% das proteínas da clara e pode ser encontrada nas formas A₁, A₂ e A₃ na proporção 85:12:3,

respectivamente. A diferença entre essas formas está na quantidade de fósforo ligado à proteína: 2, 1 ou 0 átomos de fósforo por mol de ovalbumina, respectivamente. A ovalbumina possui massa molar de 45 kDa, uma ponte dissulfeto e quatro grupos sulfidrilos livres, que só reagem após a desnaturação da proteína, o que indica que, na forma nativa, os grupos sulfidrilos estão protegidos em regiões hidrofóbicas da proteína. Cerca de 50% dos aminoácidos da ovalbumina são hidrofóbicos. Essa proteína possui glicina acetilada no terminal N e prolina no terminal carboxílico. Contém uma única cadeia lateral de carboidrato formada de D-manose e N-acetilglicosamina (SGARBIERI, 1996; FENNEMA, 1993).

A ovalbumina em solução é facilmente desnaturada por exposição de sua superfície (por exemplo na agitação), mas é relativamente estável ao tratamento térmico. O aquecimento da clara a 62 °C, em pH 9,0 por 3,5 min, alterou somente 3 a 5% da proteína enquanto o aquecimento nas mesmas condições, mas em pH 7,0, praticamente não causou alterações. Seu ponto isoelétrico está em pH ao redor de 4,6 (FENNEMA, 1993).

1.2.2. Ovotransferrina (conalbumina)

É uma glicoproteína facilmente isolada por precipitação fracionada com sulfato de amônio. Representa 12% das proteínas da clara, tem massa molar de 76,6 kDa e é formada de um único polipeptídeo. Contém, ainda, 0,8% de hexose e 1,4% de hexosamina; não possui grupo sulfidrilo livre ou radical prostético. Seu ponto isoelétrico está em pH próximo de 6,0, e todas as transferrinas conhecidas ligam-se ao ferro, dando uma coloração avermelhada aos sistemas, com uma absorção máxima a 465 nm. Os sítios de complexação de ferro pelas diferentes transferrinas parecem ser similares, e os ligantes são, em geral, cadeias laterais dos mesmos aminoácidos. A forte tendência de ligação do ferro à ovotransferrina confere a esta proteína, assim como às transferrinas em geral, propriedades bacteriostáticas. Quando não ligada ao ferro, a ovotransferrina é mais sensível ao tratamento térmico do que a ovalbumina, porém menos suscetível à desnaturação de superfície (SGARBIERI, 1996; FENNEMA, 1993).

1.2.3. Ovomucóide

A ovomucóide é uma glicoproteína termorresistente, que pode ser isolada da clara, por precipitação das demais proteínas. É formada de uma única cadeia polipeptídica com segmentos helicoidais (aproximadamente 22%) e segmentos desorganizados (estrutura primária). A molécula contém oito ligações dissulfeto com ocorrência de um resíduo de cistina, em média, a cada 11 resíduos de aminoácidos, contendo também entre 20 e 25% de carboidratos, representados por cinco sacarídios diferentes ligados à asparagina, através de N-acetilglicosamina. A ovomucóide é um inibidor específico da tripsina, formando com essa enzima um complexo 1:1. A complexação com tripsina aumenta a estabilidade da ovomucóide à desnaturação térmica (SGARBIERI, 1996; FENNEMA, 1993).

1.2.4. Ovomucina

É uma glicosulfoproteína e representa 3,5% do total de proteínas da clara. Difere das demais proteínas da clara de ovo por apresentar estrutura fibrilar, conter ésteres sulfúricos, galactosamina, cerca de 50% de todo o ácido siálico da clara e grande quantidade de cistina que interliga as subunidades por pontes intermoleculares. Em solução, a ovomucina purificada é resistente à desnaturação pelo calor (LINDEN e LORIENT, 1996, SGARBIERI, 1996; POWRIE e NAKAI, 1993).

1.2.5. Lisozima

A lisozima representa 3,4% das proteínas da clara do ovo com massa molar de 14,3 kDa e ponto isoelétrico de 10,7. Sua ação enzimática inclui a clivagem de polissacarídeos, ligação glicosídica β -1,4 entre N-acetilglicosamina e ácido murâmico, em parede celular de bactérias. Além da atividade glicosídica, possui também atividade de transglicosidade e de esterase, exercendo uma ação antimicrobiana (SGARBIERI, 1996; POWRIE e NAKAI, 1993). Esta enzima é homóloga à lisozima humana e à α -lactoalbumina. Apresenta-se como um dímero em pH entre 5,0 e 9,0. É formada de um único polipeptídeo com 129 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto, não possuindo grupos sulfídricos livres.

É uma enzima cuja estabilidade fora do comum, é atribuída à sua estrutura compacta, com quatro pontes dissulfeto intramoleculares e a presença de apenas três moléculas de água por molécula de lisozima (SGARBIERI, 1996; FENNEMA, 1993).

1.2.6. Outras proteínas da clara

A avidina é uma proteína que se encontra unida à biotina. É uma glicoproteína básica constituída por 128 resíduos de aminoácidos e tem ponto isoelétrico em torno de 10. As globulinas G₁ e G₂ do ovo são consideradas agentes espumantes. A ovoinibidor é capaz de inibir a tripsina e a quimotripsina. A flavoproteína é formada por uma apoproteína unida à riboflavina (LINDEN e LORIENT, 1996; SGARBIERI, 1996).

1.3. Gema

A gema é uma dispersão composta por gotas de lipídios na fase aquosa contínua (ou plasma) e possui cerca de 50% de sólidos. As proteínas e os lipídios são os seus maiores constituintes, em uma razão aproximada de 2:1 de lipídios para proteínas. Tanto do ponto de vista químico quanto funcional, as proteínas e os lipídios da gema devem ser considerados em conjunto, devido ao fato de formarem os complexos proteína-fosfolipídios (lipoproteínas) que são responsáveis pelas propriedades emulsificantes da gema (MINE e BERGOUGNOUX, 1998). Ambas as frações têm uma importância particular em processamentos na indústria de alimentos, na formulação de cosméticos e como componentes bioativos da indústria farmacêutica (KWAN et al., 1991; CARRILLO e KOKINI, 1988). As propriedades emulsificantes da gema devem-se ao seu elevado conteúdo de fosfolipídios e ao fato de que todos os lipídios (incluindo os triglicerídios) são associados a pelo menos duas proteínas, a vitelina e a vitelenina (LINDEN e LORIENT 1996; CHUNG e FERRIER, 1991). Na Tabela 5 é apresentada a composição protéica da gema.

As proteínas podem ser simples (globulares) ou complexas (lipoproteínas). A fração lipídica é constituída por aproximadamente 66% de triglicerídios; 28% de fosfolipídios e 5% de colesterol (SANTOS, 1999). A gema pode ser fracionada por centrifugação em duas partes, no plasma e em partículas sólidas granulares, sendo as lipoproteínas o maior

constituente de ambas as fases (LINDEN e LORIENT, 1996; BLACKWELDER e PIKE, 1990; KIOSSEOGLOU, 1989). O plasma contém lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e uma fração protéica globular solúvel em água, a livetina. A fração do grânulo, além do colesterol, dos fosfolipídios e dos triglicerídios, possui lipoproteínas de alta densidade (HDL), a lipovitelina e a fosfoproteína fosfovítina (BURLEY e VADEHRA, 1989; BERLITZ e GROSCH, 1987).

Tabela 5 - Composição protéica da gema de ovo

Proteína	Extrato Seco (%)	Fração Protéica (%)	Massa Molar (kDa)	Conteúdo de Lipídios (%)	Teor de Fósforo (%)	Localização
Fosvitina	4	10	36	0	10	Grânulos
Lipovitelina HDL	16	36	400	20	α :0,5; β :0,25	Grânulos
Lipovitelinas LDL	68	24	300-1000	88	0,1	Fase contínua
Livetinas	10	30	α : 80 β : 45 γ :150	0	-	Fase contínua
YRBP (proteína de ligação da riboflavina)	1,5	0,4	36	0	0,2	

Fonte: Linden e Loriet (1996).

Os fosfolipídios são ésteres derivados dos ácidos fosfatídicos, compostos por glicerol, dois ácidos graxos e um grupo fosfato. Os fosfolipídios diferem-se, principalmente, no composto específico ligado ao grupo fosfato. Quando a base nitrogenada é a colina, tem-se a lecitina; caso seja a etanolamina ou serina, tem-se a cefalina (SANTOS, 1999). Segundo LINDEN e LORIET (1996), os fosfolipídios da gema de ovo são compostos de 71 a 76 % de fosfatidilcolina (lecitina), 16 a 20% de fosfatidiletanolamina (cefalina) e 8% de esfingomelina e 9% de lisofosfolipídios.

O colesterol é um esteróide de 27 carbonos derivado de uma estrutura cíclica denominada ciclopentaperidrofenantreno de natureza não-polar, devido à presença de grupos hidrofóbicos metil (CH₃) na sua estrutura (BRAGAGNLO, 1992; SION et al., 2001). O colesterol está presente na gema do ovo em quantidades variáveis, dependendo do genótipo das aves (STADELMAN e COTTERILL, 1995). Considerando que um ovo

possui uma faixa de 180 a 250 mg de colesterol (ELSWYK et al., 1991; MCNAMARA, 1987) e que, para o homem, a ingestão diária recomendada pela Associação Norte-Americana do Coração (“American Heart Association”, AHA) é de 300 mg por dia, tem-se que um ovo contribui em média, com aproximadamente 71% da quantidade diária recomendada. A AHA sugere, ainda, que se limite o consumo de ovos a três por semana (SANTOS, 1999). Segundo Metzler (1997), a importância biológica do colesterol reside no fato de ser precursor de esteróis nos tecidos animais, incluindo os ácidos biliares, androgênios, estrogênios, progesterona e os hormônios adrenocorticais; além de ser um constituinte da membrana celular e ainda participar da síntese da vitamina D₃. Níveis de colesterol elevados ou sua presença em gorduras saturadas no sangue têm sido relacionados com cardiopatias coronárias e arteriosclerose (ANDERSON, 1976; JOHNSON, 1996; MISSLER, et al., 1985; REISER, 1978). Adicionalmente, estudos toxicológicos evidenciam que produtos de autooxidação do colesterol também estão relacionados a doenças coronárias, além de serem potencialmente citotóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e inibidores de biossíntese de esteróides (ADDIS e WARNER, 1991; SMITH, 1981; BISHOFF, 1969). Produtos da oxidação do colesterol, já foram detectados em ovos desidratados por atomização, como por exemplo, o 5,6 α -epoxicolesterol, potencialmente carcinogênico (NABER e BIGGERT, 1985; TSAI e HUDSON, 1984). Segundo SALVA (1996), tal discussão tem levado o consumidor a adquirir no mercado, alimentos mais saudáveis, com baixas concentrações ou isentos de colesterol, embora alguns estudos tenham apresentado dados que descartam a relação entre o consumo regular de ovos e o aumento do nível de colesterol. Segundo esses estudos, o aspecto mais relevante em relação à qualidade do ovo relaciona-se com a segurança alimentar e não com o nível de colesterol (www.apa.com.br; acesso em: 15/06/2004).

Os ácidos graxos presentes na gema de ovo são usualmente saturados na posição α e insaturados na posição β , possuindo grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que lhes permitem desempenhar importante papel como agentes emulsificantes de gorduras (DEUEL, 1951). A composição dos ácidos graxos depende diretamente da dieta. Assim, a quantidade de ácidos graxos saturados, principalmente palmítico e esteárico, não varia com as mudanças na composição dos ácidos graxos da dieta, mas o ácido linoléico aumenta e o oléico diminui com a elevação do teor de ácidos graxos polinsaturados na dieta (POWRIE e

NAKAI, 1993). Na Tabela 6, pode-se observar o conteúdo, em ácidos graxos, das distintas frações lipídicas da gema. O ácido palmítico (16:0) e o esteárico (18:0) representam 30% dos ácidos graxos totais dos triglicerídios, no entanto a soma de ambos representa 49% da fosfatidilcolina (lecitina) e 54% da fosfatidiletanolamina (cefalina).

Tabela 6 - Composição dos ácidos graxos da fração lipídica da gema

Ácido Graxo	Total de Ácidos Graxos (%)			
	Lipídios totais	Triglicerídios	Lecitina	Cefalina
16:0	23,5	22,5	37	21,6
16:1	3,8	7,3	0,6	-
18:0	14	7,5	12,4	32,5
18:1	38,4	44,7	31,4	17,3
18:2	16,4	15,4	12	7
18:3	1,4	1,3	1	2
20:4	1,3	0,5	2,7	10,2
20:5	0,4	0,2	0,8	3
22:5	-	-	-	-
22:6	0,8	0,6	2,1	6,4

Fonte: Fenema (1993).

2. Identificação da qualidade do ovo

A qualidade do ovo é baseada nas características que afetam a aceitabilidade do consumidor. Por muitos anos foram avaliados vários métodos para especificação dos diferentes fatores de qualidade. Segundo Mountney (1977), os ovos são classificados e avaliados segundo sua característica interna e sua aparência externa. Para Penfield e Campbell (1990), os ovos são comercializados de acordo com seu peso e sua qualidade, fatores independentes um do outro.

No Brasil, segundo o MAPA (1965) o ovo, é classificado em grupos, classes e tipos, conforme a coloração da casca, a qualidade e o peso, respectivamente.

2.1. Grupos

O ovo, de acordo com a coloração da casca, é classificado em dois grupos:

Grupo I - Com casca de coloração branca ou embranquecida.

Grupo II - Com casca de coloração avermelhada.

2.2. Classes

O ovo segundo a qualidade, é ordenado em três classes:

Classe A

- Casca limpa, íntegra e sem deformação.
- Câmara de ar fixa e com o máximo de 4 mm de altura.
- Clara límpida, transparente, consistente e com as chalazas intactas.
- Gema translúcida, consistente, centralizada e sem desenvolvimento do germe.

Classe B

- Casca limpa, íntegra, permitindo-se ligeira deformação e discretamente manchada.
- Câmara de ar fixa e com o máximo de 6 mm de altura.
- Clara límpida, transparente, relativamente consistente e com as chalazas intactas.
- Gema consistente, ligeiramente descentralizada e deformada, porém com contorno bem definido e sem desenvolvimento do germe.

Classe C

- Casca limpa, íntegra, admitindo-se defeitos de textura, contorno e manchada.
- Câmara de ar solta e com o máximo de 10 mm de altura.
- Clara com ligeira turvação, relativamente consistente e com as chalazas intactas.
- Gema descentralizada e deformada, porém com contorno definido e sem desenvolvimento do germe.

Nas classes A e B é tolerada, no ato de amostragem, a percentagem de até 5% de ovos da classe imediatamente inferior.

2.3. Tipos

De acordo com o seu peso será classificado em quatro tipos (Tabela 7). Com relação aos tipos extra, grande e médio é tolerada, no ato de amostragem, a percentagem de até 10% de ovos do tipo imediatamente inferior.

Tabela 7 - Classificação do ovo em função do seu peso

Tipo	Peso Mínimo (dúzia, grama)
Extra	720
Grande	660
Médio	600
Quatro	540

Fonte: MAPA (1965).

O ovo que não apresente as características mínimas exigidas para as diversas classes e tipos estabelecidos será considerado impróprio para o consumo, sendo permitida sua utilização apenas para a indústria.

3. Valores nutricionais do ovo

O ovo é uma fonte de proteínas perfeitamente equilibrada e de lipídios facilmente digeríveis. Contém quantidades apreciáveis de fósforo, ferro e vitaminas, mas é um alimento pobre em glicídios, cálcio e vitaminas.

3.1. Valor biológico das proteínas

As proteínas do ovo são consideradas de alto valor nutritivo por conterem todos os aminoácidos essenciais necessários à espécie humana em quantidades superiores às requeridas para o crescimento e demais funções vitais (SURAI e SPARKS, 2000; LINDEN e LORIET, 1996). A utilização protéica líquida (coeficiente de uso digestivo x valor biológico) das proteínas do ovo integral e cozido alcança 94%, o que demonstra seu elevado valor biológico.

As proteínas da clara consumidas *in natura* apresentam digestibilidade de somente 50%, devido à presença de fatores antitripsicos (ovomucóide) e ao fato de a clara de ovo cru estimular pouco as secreções dos sucos gástricos e pancreáticos. A cocção, ao coagular as proteínas, facilitam o trabalho das enzimas digestivas e permite

alcançar uma digestibilidade de 92%, principalmente se o ovo for acompanhado de outros alimentos.

Assim, a cocção destrói a ligação biotina-avidina. O contrário é observado com as proteínas da gema, que são facilmente digeríveis em estado cru. Toda cocção excessiva diminui seu potencial digestivo. As proteínas da clara contém, ainda, propriedades biológicas antibacterianas diretas ou indiretas (atividades antiproteásicas, formação de complexos com vitaminas ou metais) que contribuem para a boa conservação dos ovos (LINDEN e LORIET, 1996; SGARBIERI, 1996).

3.2. Digestibilidade dos lipídios

Os lipídios da gema de ovo são facilmente digeridos pelo homem (94 a 96%), por se encontrarem em estado emulsificado. A digestibilidade é maior nos triglicerídios (98%), fração mais rica em ácidos graxos saturados. A digestibilidade dos fosfolipídios é de cerca de 90%. A riqueza da gema de ovo em ácidos graxos insaturados (aproximadamente dois terços dos ácidos graxos totais) e especialmente em ácido linoléico (ômega-6) é também um elemento nutricional importante (LINDEN e LORIET, 1996; SGARBIERI, 1996).

3.3. Minerais e vitaminas

O ovo é, juntamente com o leite, o alimento mais rico em fósforo assimilável, embora contenha pouco cálcio em relação às necessidades humanas. Uma característica nutricional da gema é também o seu teor em ferro: um ovo pode cobrir até 30% das necessidades cotidianas do homem desse elemento. Um ovo fornece também de 5 a 10% das necessidades diárias do homem de vitaminas A, B₁ e D, 20% de vitaminas B₂ e B₅ e a quase totalidade das necessidades de biotina (B₈). Assim, caso as aves recebam uma alimentação adequada, o ovo será uma fonte importante de vitaminas (LINDEN e LORIET, 1996; SGARBIERI, 1996).

4. Propriedades funcionais do ovo nos alimentos

4.1. Coagulação e gelificação

As proteínas presentes no ovo são responsáveis pela ocorrência de coagulação sob ação de agentes físicos e químicos. A termocoagulação refere-se ao processo de desnaturação pelo calor das proteínas da clara e da gema. A desnaturação protéica ocasiona a ruptura de interações não-covalentes (ligações de hidrogênio e ligações iônicas) que estabilizam a estrutura nativa da proteína, expondo e permitindo a interação de grupos hidrofóbicos presentes em seu interior (ARAÚJO, 1999). As proteínas desnaturadas interagem rapidamente, mediante ligações químicas e físicas, para gerar agregados protéicos que participam da formação de uma rede tridimensional (POWRIE e NAKAI, 1993). A agregação das proteínas desnaturadas da clara dá-se por ligações hidrofóbicas, eletrostáticas e pontes dissulfeto (MA e HOLME, 1982). A clara do ovo inicia o espessamento a 62 °C, e a 65 °C já não escoar. A 70 °C, a massa é muito firme. A gema é coagulada em uma temperatura superior à da clara. Inicia o espessamento a 65 °C e perde a sua fluidez aproximadamente a 70 °C. A coagulação não é instantânea, mas gradual, em certo intervalo de tempo (PENFIELD e CAMPBELL, 1990). As proteínas majoritárias da clara (ovalbumina e conalbumina) têm boas propriedades gelificantes. As proteínas da gema estão também sujeitas à termocoagulação, com exceção das livetelinas e da fosvitina (LINDENT e LORIET, 1996). Os principais fatores que afetam a coagulação do ovo são o binômio tempo/temperatura, grau de concentração, presença de açúcares, força iônica, pH e tipo de tratamento tecnológico (STADELMAN e COTTERILL, 1995).

Métodos reológicos e eletroforéticos podem ser usados para quantificar alterações nas proteínas e lipoproteínas da gema em temperaturas iguais ou superiores a 60 °C. Chang et al. (1970), avaliando a viscosidade da gema de ovo aquecida por 3 min a 60, 62,8 e 65,8 °C, a uma taxa de deformação de $1,9 \text{ s}^{-1}$, obtiveram valores correspondentes de viscosidade de 30, 38 e 200 cP. O aumento na viscosidade da gema com o calor deve-se à formação de complexos de proteínas e lipoproteínas por fenômenos de agregação.

Na clara, alterações decorrentes do o aquecimento da ovalbumina foram detectados empregando a espectrofotometria (SHIMADA e MATSUSHITA, 1980).

4.2. Emulsificação

Uma emulsão pode ser definida como uma mistura de dois líquidos imiscíveis, um dos quais é disperso na forma de glóbulos no outro líquido (SGARBIERI, 1996). De acordo com LINDEN e LORIET (1996), as propriedades emulsificantes da gema de ovo são atribuídas aos fosfolipídios e, principalmente, às lecitinas presentes na forma de complexos lipoprotéicos. As livetinas e lipovitelininas diminuem a tensão interfacial e facilitam a formação da emulsão, mas não influenciam a estabilidade. A gema do ovo vem sendo amplamente utilizada como ingrediente na indústria de alimentos, pois constitui um excelente agente emulsificante em produtos como maioneses, molhos para saladas, cremes e produtos de confeitaria (CHUNG e FERRIER, 1991). Contribui, também, para o estabelecimento de sabor, cor, textura e estabilidade e confere poder nutricional (BRINGE e CHENG, 1995).

4.2.1. Características da emulsão

As características que interessam em uma emulsão são a capacidade de emulsificação, atividade emulsificante e estabilidade.

A capacidade máxima de emulsificação da proteína é determinada no ponto em que se verifica o colapso ou quebra da emulsão. A quebra da emulsão poderá ser percebida de três maneiras diferentes: a) visualmente, pela separação de fases; b) por um som diferente produzido como consequência da separação das fases; c) pela queda de condutividade ou pelo aumento da resistência elétrica (AZZAM e OMARI, 2002).

A atividade emulsificante é definida como a área de interface estabilizada por uma dada concentração de emulsificante (m^2/g), sendo medida por método turbidimétrico (PEARCE e KINSELLA, 1998). Essa técnica relaciona as densidades óticas, a 550 nm de emulsões diluídas, com as áreas das superfícies interfaciais dos filmes da proteína, que envolvem as gotículas de óleo emulsificadas.

A estabilidade da emulsão pode ser compreendida como a capacidade da emulsão para conservar a sua estrutura ao longo do tempo. A medida pode ser direta (evolução do

tamanho das gotículas ao longo do tempo, empregando-se um granulômetro) ou indireta, através da evolução das quantidades de óleo ou de fase aquosa separadas após um tratamento de desestabilização por centrifugação ou aquecimento (ANTON et al., 2000).

4.3. Poder espumante

É uma propriedade funcional de interface que depende da natureza, da solubilidade e do estado de desnaturação da proteína, da presença de sais e de outros aditivos empregados no processamento dos alimentos. A espuma da clara é uma suspensão coloidal formada por bolhas cercadas por albúmen, o qual sofreu alguma desnaturação na interface líquido-ar. Contribui, assim, para o esponjamento de alguns alimentos como os merengues, suflês, e outros produtos de padaria (SGARBIERI, 1996; PENFIELD e CAMPBELL, 1990). A capacidade de formação de espuma da clara é uma propriedade decorrente da presença da ovomucina, globulinas e ovalbumina em sua constituição. Essas proteínas hidrosolúveis são tensoativas e situam-se nas interfaces ar-água, onde orientam seus grupos hidrofóbicos para o ar e os hidrofílicos para a fase aquosa. Tais orientações determinam o desligamento das proteínas e a conformação de uma estrutura enovelada ao acaso (POWRIE e NAKAI, 1993).

As proteínas hidrosolúveis exibem qualidades máxima para formação de espuma no seu pH *in natura* (pH 8 a 9), assim como na região de seu ponto isoelétrico (pH 4 a 5) (LINDEN e LORIET, 1996).

Os fatores que afetam a propriedade espumante da clara são: método, tempo e temperatura de agitação, características da clara, do pH e da presença de outras substâncias, como água, gorduras, cloreto de sódio, açúcar, gema de ovo e aditivos (LINDEN e LORIENT, 1996; PENFIELD e CAMPBELL, 1990).

4.3.1. Métodos de medição do poder espumante

A capacidade espumante é definida como a quantidade de espuma formada por unidade de volume da solução (ou por unidade de massa de soluto), medido pela determinação do volume máximo da espuma (BLACKWELDER e PIKE, 1990) ou da

condutividade mínima. A estabilidade espumante é a capacidade da espuma em conservar sua estrutura ao longo do tempo.

4.4. Outras propriedades funcionais

A clara apresenta capacidade anticristalizante retardando a cristalização da sacarose em soluções saturadas e melhorando a homogeneidade e a textura de produtos de confeitaria (LINDEN e LORIENT, 1996; YANG e BALDWIN, 1995).

Os pigmentos naturais responsáveis pela cor da gema, como as xantofilas e os carotenos, auxiliam a conferir a cor amarela em muitos alimentos, como em produtos assados, talharins, sorvetes de creme, pudins, molhos e omeletes (STADELMAN e COTTERILL, 1995).

Um dos fatores que influenciam a aceitação do ovo é o seu sabor, sendo os constituintes voláteis do ovo formados por hidrocarbonetos saturados e insaturados, fenóis, indóis, pirróis, pirazinas e sulfetos (MAGA, 1982; ROMANOFF e ROMANOFF, 1949).

5. Técnicas de separação das biomoléculas do ovo

Dentre os diferentes métodos para o isolamento de biomoléculas, os processos cromatográficos por adsorção apresentam potencial para uso no fracionamento de biomoléculas do ovo. As proteínas da clara foram purificadas por cromatografia por troca iônica, utilizando-se a resina Q-Sepharose (Pharmacia) (CROGUENEC et al. 2000; VACHIER et al., 1995) e a resina DE92 Celulose® (Whatman) (LEVISON et al., 1992). AWADE e EFSTATHIOU (1999) usaram com tal fim a cromatografia de fase reversa, com base em suas propriedades hidrofóbicas.

Embora a adsorção seja adequada, é limitada por usar solventes orgânicos na eluição das biomoléculas. Fosfolipídios também podem ser separados utilizando cromatografia, com base na polaridade e não-polaridade da fase estacionária (AMARI et al., 1990; GROSS e SOBEL, 1980; CHEN e KOU, 1982; YOON e KIM, 2002).

Para eliminação do colesterol da gema foram empregadas a extração por solventes orgânicos (MARTUCCI e BORGES, 1997; KWAN et al., 1991), a extração supercrítica

utilizando dióxido de carbono (FRONING et al., 1990), a biotransformação do colesterol por ação de enzimas (CHENFENG et al., 2002) e a complexão usando β -ciclodextrinas (WILLIAMS et al., 1998), com base nas interações hidrofóbicas do colesterol com a β -ciclodextrina.

6. Adsorção

O processo de separação por adsorção pode ser brevemente descrito, considerando-se o escoamento de um fluido, que contém o soluto, entre os espaços vazios externos das partículas adsorventes. O soluto é transportado por difusão, através de um filme externo, para a partícula e adsorvido na superfície externa ou no interior dos poros e em um sítio desocupado, devido a forças elétricas, físicas ou por reações químicas. Cada molécula pode ser adsorvida e desorvida várias vezes enquanto permanecer dentro de uma partícula. Depois de desorvida, atravessa o filme externo, atingindo o fluido em movimento. Uma vez dentro do fluido em movimento, é carregada com a mesma velocidade do fluido até que seja transportada por difusão para outra partícula, repetindo-se todo o processo (WANKAT, 1986; COLLINS et al., 1997).

Na maioria de separações realizadas por adsorção são usadas partículas totalmente porosas, sendo importante que essas partículas apresentem uma grande área superficial. As partículas dos adsorventes normalmente têm formas e tamanhos diferentes e apresentam porosidade média entre partículas, a qual, dependendo de um bom empacotamento, será constante ao longo da coluna (COLLINS et al., 1997). A fase estacionária (adsorvente) é escolhida de forma a permitir a interação diferencial com os componentes da amostra a serem separados. As atrações intermoleculares responsáveis pela adsorção incluem as forças de Van der Waals e eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas .

6.1. Cromatografia por interação hidrofóbica (CIH)

A cromatografia por interação hidrofóbica (CIH) tem por fundamento as interações hidrofóbicas dos ligantes imobilizados na fase estacionária com as regiões não-polares das biomoléculas. A adsorção pode ser aumentada com a elevação do teor de sal na fase móvel

e a eluição é alcançada pela redução da concentração de sal no eluente (MELANDER et al., 1984; FAUSNAUGH e REGNIER, 1986).

Como a cromatografia de fase reversa (CFR), a CIH pode ser usada aproveitando-se as características hidrofóbicas das proteínas, mas apresenta as vantagens de trabalhar em ambientes mais polares e menos desnaturantes. Adicionalmente, não necessita de solventes apolares, como na CFR para a eluição das proteínas, devido à fraca ligação das biomoléculas com o adsorvente (EL RASSI, 1996).

O efeito hidrofóbico pode ser definido como o resultado de uma menor interação de substâncias apolares com outras polares. O termo interação hidrofóbica pode, então, ser usado para representar as forças advindas da associação de moléculas apolares em soluções aquosas (VAILAYA e HORVÁTH, 1996). A hidrofobicidade também pode ser relacionada com modelos moleculares envolvendo o ordenamento de moléculas de água em torno de solutos apolares.

Quando componentes apolares estão presentes em ambiente aquoso, é observado um aumento no grau de ordenamento das moléculas de água que cercam os grupos hidrofóbicos. Nesse caso, verifica-se um decréscimo na entropia do sistema ($\Delta S < 0$). Como as mudanças na entalpia são pequenas, comparadas com os valores de $T\Delta S$, é computada uma variação positiva na energia livre de Gibbs ($\Delta G > 0$), de acordo com a eq. (1) (Queiroz et al., 2001):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

6.1.1. Fatores que afetam a CIH

A escolha das fases estacionária e móvel é fundamental para o bom desempenho da CIH. Nos primeiros tipos de fases estacionárias hidrofóbicas desenvolvidas, diferentes aminoácidos apolares (ligantes) foram inseridos em um suporte (ou matriz) inerte, como a agarose (de amplo uso), celulose, dextrina e sílica. Essas fases tinham características hidrofóbicas e iônicas, resultando da ligação de aminas alifáticas e aromáticas nos poros da agarose (Sheparose). Porath, em 1973, e Hjerten, em 1974, foram os primeiros a sintetizar absorventes com cargas hidrofóbicas livres (QUEIROZ et al., 2001; HJERTEN et al.,

1974). GUSTAVSSON et al. (1999) testaram um novo suporte para CIH, o agarose superporous®, com bons resultados na separação de misturas protéicas.

Na atualidade, as fases estacionárias para CIH se diferenciam pelo tipo de ligante, tamanho da cadeia do ligante, densidade do ligante e tipo de matriz. Na Figura 2, apresentam-se diferentes estruturas de ligantes para CIH. A maioria dos ligantes são alcanos de cadeia linear com ou sem um grupo terminal amino. Compostos aromáticos usados como ligantes apresentaram bons resultados, por proporcionarem, além das interações hidrofóbicas, as ligações aromáticas (π - π).

Segundo QUEIROZ et al. (2001), pode-se elevar a hidrofobicidade e a força de interação aumentando o tamanho da cadeia n-alkil, embora a seletividade da adsorção possa diminuir. Os suportes são, em sua maioria compostos por carboidratos hidrofílicos (agarose), sílica ou material de copolímeros sintéticos. Para um mesmo tipo de ligante, a seletividade da fase estacionária será alterada em função do suporte empregado.

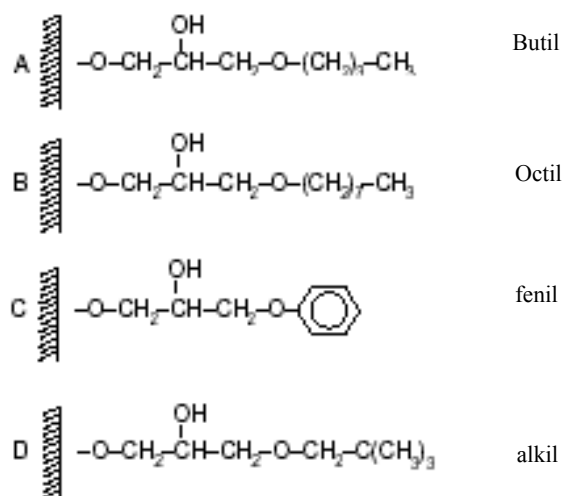


Figura 2 - Estrutura dos ligantes usados na CIH.

A retenção das biomoléculas é também influenciada por características da fase móvel, como tipo de sal, concentração de sal, pH, temperatura e presença de aditivos.

Os sais de sódio, potássio ou sulfato de amônio são mais efetivos para promover as interações ligante-proteína, devido ao aumento da tensão superficial e dos efeitos de

“salting out”. Embora o sulfato de magnésio e o cloreto de magnésio aumentem a tensão superficial da água (Tabela 8), não aumentam a retenção da proteína. Alterações no tipo de sal que compõe a fase móvel influenciam a retenção das proteínas e, portanto, a seletividade da separação (RIPPEL e SZEPESY, 1994). Assim, pode-se observar que a influência da concentração de sal sobre a retenção das proteínas é um fenômeno complexo.

Tabela 8 - Elevação da tensão superficial (σ) na presença de diferentes sais

Sal	$\sigma \times 10^3$ (dina · g /cm · mol)
KClO ₄	1,40
NaCl	1,64
Na ₂ HPO ₄	2,02
MgSO ₄	2,10
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,16
K ₂ SO ₄	2,58
Na ₂ SO ₄	2,73
MgCl ₂	3,16

O pH da fase móvel também afeta a retenção de biomoléculas. Geralmente uma elevação no pH (acima de 9) diminui o grau de interação hidrofóbica entre as proteínas e os ligantes, devido ao aumento do caráter hidrofílico das proteínas decorrente de mudanças na sua carga (STROP et al., 1983; HJERTÉN, 1973). QUEIROZ et al. (2001) observaram que uma redução no pH, aparentemente, aumentou o grau das interações hidrofóbicas.

6.1.2. Aplicações da CIH

A CIH é uma técnica versátil, de fácil inserção em uma estratégia de purificação e compatível com outras técnicas cromatográficas. Na Tabela 9 são mostradas algumas aplicações da CIH para purificação de biomoléculas.

Tabela 9 - Biomoléculas purificadas com CIH

Biomolécula	Referência
α -amilase	Liang et al. (1999) e Linden et al. (2000)
Proteína ligada ao cálcio	Ehlermann et al. (2000)
Celulose	Tomaz e Queiroz (1999)
Desidrogenase	Yang et al. (1992)
D-hidantoinase	Abendroth et al. (2000)
Hormônios	Chlenov et al. (1993)
Inmunoglobulina	Bridonneau e Lederer (1993)
Lipase	Queiroz at al. (1996) e Diogo et al. (1999)
Membrana protéica	Wenk e Kruip (2000)
Placenta protéica	Berkovsky e Potapov (1994)
Proteínas do soro humano	Hrkal e Rejnkova (1982), Berna et al. (1998) e Husi e Walkinshaw (1999)

7. Referências Bibliográficas

ABENDROTH, J.; CHATTERJEE, S.; SCHOMBURG, D. Purification of a D-hydantoinase using a laboratory-scale Streamline phenyl column as the initial step. **J. Chromatogr. B**, v. 737, p. 187-194, 2000.

ADDIS, P. B.; WARNER, G. J. The potential health aspects of lipid oxidation products in food. **Free radicals and food additives**. London: Aruoma O I. and Halliwell B. Ed. 1991, p.77-119.

AMARI, J. V.; PHYLLIS, R.; BROWN, C. M. G.; TURCOTTE, J. G. Isolation and purification of lecithin by preparative high-performance liquid chromatography. **Journal of Cromatogr. A**, v. 517, p. 219-228, 1990.

American Society of Heating, Refrigeration and Air Conditioning Engineers Inc (ASHARE),. “**Handbook and Product Directory Application**”, 23, Georgia, 1994.

ANDERSON, J. T.; GRNDE, F.; KEYS, A. Independence of the effects of cholesterol and degree of saturation of the fat in the diet on serum cholesterol in man. **The American of Clinical Nutrition**, v. 29, p. 1184-1187, 1976.

ANTON, M.; BEAUMAL, V.; GANDEMER, G. Adsorption at the oil-water interface and emulsifying properties of native granules from egg yolk: effect of aggregated state. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 327-335, 2000.

ARAUJO, J. M. A. **Química de alimentos - Teoria e prática**, Vicosa, MG: UFV, 1999. p.309.

- AVES e OVOS, Disponível em: <http://www.aveseovos.com.br>, Acesso em: junho 2004.
- AWADE, A. C.; EFSTATHIOU, T. Comparison of three liquid chromatographic methods for egg-white protein analysis. **Journal of Chromatogr. B**, v. 723, p. 69-74, 1999.
- AZZAM, M. O. J.; OMARI, R. M. Stability of egg white-stabilized edible oil emulsions using conductivity technique. **Food Hydrocolloids**. v. 16, p. 105-110, 2002.
- BERLITZ, H. D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. New York: Springer-Verlag, 1987.
- BERNA, P. P.; BERNA, N.; PORATH, J.; OSCARSSON, S. Comparison of the protein adsorption selectivity of salt-promoted agarose-based adsorbents. Hydrophobic, thiophilic and electro donor-acceptor adsorbents. **J. Chromatogr. A**, v. 800, p. 151-159, 1998.
- BERKOVSKY, A. L.; POTAPOV, P. P. Use of metal-chelate affinity chromatography and hydrophobic interaction chromatography for purification of placental protein 12. **J. Chromatogr. B**, v. 656, p. 432-435, 1994.
- BISHOFF, F. F. Carcinogenic effects of steroids. **Advances in lipid research**. New York: R. Paoletti and Kritchevsky, 1969, p.165-244.
- BLACKWELDER, J. A.; PIKE, O. A. Oxidative stability of cholesterol-free egg lipid fractions. **J. Food Sci.**, v. 55, n. 1, p. 92-95, 1990.
- BORA, P. S. Functional properties of native and succinylated lentil (*Lens culinaris*) globulins. **Food Chemistry**, v. 77, p. 171-176, 2002.
- BRAGAGNLO, N. **Determinação dos teores de colesterol em carnes, ovos e massa com ovos**. Campinas, SP: UNICAMP, 1992. 105 f. Dissertação (Mestrado).
- BRINGE, N. A.; CHENG, J. Low-Fat, Low- Cholesterol Egg Yolk in Food Applications. **Food Technology**, May, p. 94-104, 1995.
- BRIDONNEAU P.; LEDERER, F. Behaviour of human immunoglobulin G subclasses on thiophilic gels: comparison with hydrophobic interaction chromatography. **J. Chromatogr B**, v. 616, p. 197-204, 1993.
- BURLEY, R. W.; VADEHRA, D. V. **The avian egg: chemistry and biology**. New York: John Wiley, 1989.
- CARRILLO, A. R.; KOKINI, J. L. Effect of egg yolk and egg yolk + salt on rheological properties and particle size distribution of model oil-water salad dressing emulsions. **J. Food Sci.**, v. 53, p. 1352-1355, 1988.
- CHANG, P. K.; POWRIE, W. D.; FENNEMA O. R. Effect of heat treatment on viscosity of yolk. **J. Food Sci.**, v. 35, p. 864-867, 1970.

- CHARLEY, H. **Food Science**. 2 ed. New York: John Willey & Sons, 1982, 564p.
- CHUNG, S. L.; FERRIER, L. K. Partial lipid extraction of egg yolk powder: effects on emulsifying properties and soluble protein fraction. **J. Food Sci.**, v. 56, n. 5, p. 1255-1258, 1991.
- CROGUENNEC, T.; NAU F.; PEZENNEC, S.; BRULE, G. Simple rapid procedure for preparation of large quantities of ovalbumin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 4883-4889, 2000.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas, SP: Editora Unicamp, 1997. 279 p.
- TELIS-ROMERO J.; COIMBRA, J. S. R.; GABAS, A. L.; MININ, L. A.; ROJAS, G. E. E. Density, heat capacity and thermal conductivity of liquid egg products as a function of temperarute and water content (sometido ao **J. Food Engineering**), 2004.
- CHEN, S-H S.; KOU, A. Y. Improved procedure for the separation of phospholipids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Cromatogr. A**, v. 227, p. 25-31, 1982.
- CHENFENG, L. V.; TANG, Y.; WANG, L.; WENMING, J.; CHEN, Y.; YANG, S.; WANG, W. Bioconversion of yolk cholesterol by extracellular cholesterol oxidase from *Brevibacterium sp.* **Food Chemistry**, v. 77, p. 457-463, 2002.
- CHLENOV, M. A., KANDYBA, E. I.; NAGORNAYA, L. V.; ORLOVA, I. L.; VOLGIN, Y. V. High-performance liquid chromatography of human glycoprotein hormones. **J. Chromatogr.**, 631, 261-267, 1993.
- DEUEL, H. J. **The lipids their chemistry and biochemistry**. New york: Interscience Publishers, Inc.,v.1, 982p. 1951.
- DIOGO, M. M.; SILVA, S.; CABRAL, J. M. S.; QUEIROZ, J. A. Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polypropylene glycol immobilized on Sepharose. **J. Chromatogr. A**, v. 849, p. 413-419, 1999.
- EHLERMANN, P.; REMPPIS, A.; MOST, P.; BERNOTAT, J.; HEIZMANN, C. W.; KATUS, H. A., Purification of the Ca² binding protein S100A1 from myocardium and recombinant *Escherichia coli*. **J. Chromatogr. B**, v. 737, p. 39-45, 2000.
- ELSWYK, M. E. V.; SCHAKE, L. S.; HARGIS, P. S. Evaluation of two extraction methods for the determination of egg yolk cholesterol, **Poultry Sci.**, v. 70, p. 1258-1260, 1991.
- EL RASSI, Z. Recent progress in reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrate species. **J. Chromatogr. A**, v. 720, p. 93-118, 1996.

FAUSNAUGH, J. L.; REGNIER, F. E. Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. **J. Chromatogr A**, v. 359, p. 131-146. 1986.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2 ed. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A, 1993. 1095p.

FRONING, G. W.; WEHLING, R. L.; CUPPETT, S. L.; PIERCE, M. M.; NIEMANN, L.; SIEKMANK, D. K. Extraction of cholesterol and other lipids from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide. **J. Food Sci.**, v. 55, n. 1, p. 95-98, 1990.

GUSTAVSSON, P.-E.; AXELSSON, A.; LARSSON, P.-O., Superporous agarose beads as a hydrophobic interaction chromatography support. **J. Chromatogr. A**, v. 830, p. 275-284, 1999.

GROSS, W. R.; BURTON, E. S. Isocratic high-performance liquid chromatography separation of phosphoglycerides and lysophosphoglycerides. **J. Chromatogr. A**, v. 197, p. 79-85, 1980.

HJERTE'N, S.; ROSENGREN, J.; PAHLMAN, S. Hydrophobic interaction chromatography. The synthesis and the use of some alkyl and aryl derivatives of agarose. **J. Chromatogr A**, v. 101, p. 281-288, 1974.

HJERTE'N, S. Some general aspects of hydrophobic interaction chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 87, p. 325-331, 1973.

HRKAL, Z.; REJNKOVA', L. Hydrophobic interaction chromatography of serum proteins on Phenyl-Sepharose CL- 4B. **J. Chromatogr. A**, 242, 385-388, 1982.

HUSI, H.; WALKINSHAW, M. D. Separation of human vitamin K-dependent coagulation proteins using hydrophobic interaction chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 736, p. 77-88, 1999.

JOHNSON, C. B. Isolation of Cholesterol Oxidation Products from Animal Fat Using Aminopropyl Solid-Phase Extrsaction, **J. Chromatogr. A**, v. 736, p. 205-210, 1996.

KIOSSEOGLU, V. D. Egg yolk. In: CHARALAMBOUS G.; DOXASTAKIS G. (Eds.). **Developments in food science**. Food emulsifiers. Chemistry, technology, functional properties and applications. Amsterdam: Elsevier, p. 63, 1989.

KORHONEN, H.; PIHLANTE-LEPPALA, A.; PIRJO, R.; TUPASELA, T. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. **Trends in Food Science & Technology** v. 9, p. 307-319, 1998.

KWAN, L.; LICHAN, E.; HELBIG, N.; NAKAI, S. Fractionatin of water-soluble and Insoluble Components from egg yolk with minimum use of organic solvents. **J. Food Sci.** v. 56, n. 6, p. 1537-1541, 1991.

LEVISON, P. R.; BADGER, S. E.; THOME, D. W.; KOSCIELNY, M. L.; LANE, L.; BUTTS, E. T. Economic considerations important in the scale-up of a ovalbumin separation from hen egg-white on the anion- exchange cellulose DE92. **J. Chromatogr. A**, v. 590, p. 49-58, 1992.

LI-CHAN, E. C. Y.; POWRIE, W. D.; NAKAI, S. **The chemistry of eggs and egg products**. In: STADELMAN W. J.; COTTERILL O. J. (Eds.). **Egg Science and Technology** New York: The Haworth Press, 1995, p. 105-176.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica agroindustrial**, Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1996.

LIANG, H.; WANG, Y.; WANG, Q.; RUAN, M.-S. Hydrophobic interaction chromatography and capillary zone electrophoresis to explore the correlation between the isoenzymes of salivary α -amylase and dental caries. **J. Chromatogr. B**, v. 724, p. 381–388, 1999.

LINDEN, A.; NIEHAUS, F.; ANTRANIKIAN, G. Single-step purification of a recombinant thermostable α -amylase after solubilization of the enzyme from insoluble aggregates. **J. Chromatogr. B**, v. 737, p. 253–259, 2000.

MA, C. Y.; HOLME, J. Effect of chemical modifications on some physicochemical properties and heat coagulation of egg albumen. **J. Food Sci.**, v. 47, p. 1454-1459, 1982.

MAGA, J. S. Egg and egg product flavor. **J. Agric. Food Chem.**, v. 30, p. 9-14, 1982.

MCNAMARA, D. J. The role of cholesterol and fat. **Journal of american Oil chemistry society**, v. 64, n. 12, p. 1565-1574, 1987.

METZLER, D. E. **Biochemistry- the chemical reactions of living cells**. London: Academic Press, p. 727 –735, 1997.

MINE, Y.; BERGOUGNOUX M. Adsorption properties of cholesterol reduced egg yolk low-density lipoprotein at oil-in- water interfaces. **J. Agric. Food Chem.** v. 46, p. 2152-2158, 1998.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO (MAPA) **Decreto** N° 56.585, de 20 de julho de 1965. (Brasil).

MISSLER, S. R.; WASILCHUCK B. A.; MERRITT Jr. Separation and Identification of Cholesterol Oxidation Products in Dried Egg Preparations, **J. Food Sc.**, v. 50, p. 595-598, 1985.

MOUNTNEY, G. J. Poultry and egg technology, In Desrosier N. W. (ed.) **Elements of food technology**. Connecticut: Publishing Company Inc, 1977.

NABER, E. C.; BIGGERT, M. D. Analysis for and generation of cholesterol oxidation products in egg yolk by heat treatment. **Poultry Science**, v. 64, p. 341-347, 1985.

MARTUCCI, E. T.; BORGES, S. V. Extraction of cholesterol from dehydrated egg yolk with acetone: determination of the practical phase equilibrium and simulation of the extraction process. **J. Food Engineering**, v. 32, p. 365-373, 1997.

MELANDER, W.; CORRADINI, D.; HORVA'TH, C. Salt mediated retention of proteins in hydrophobic interaction chromatography. Application of solvophobic theory. **J. Chromatogr. A**, v. 317, p. 67-85, 1984.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. **J. Agri. Food Chem.**, v. 26, p. 716-723, 1998.

PENFIELD, M. P.; CAMPBELL, A. M. **Experimental Food Science**. California: Academic Press, 1990.

POWRIE, D. W.; NAKAI, S. Características de los alimentos líquidos de origen animal: huevos. In FENNEMA O. R. (ed.) **Química de los alimentos**, 2 ed. Zaragoza: Editorial Acribia S.A. p 931-958, 1993.

QUEIROZ J. A.; TOMAZ C. T.; CABRAL J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **J. Biotechnol.**, v. 87, p. 143-159, 2001.

QUEIROZ, J. A.; GARCIA, F. A. P.; CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polyethylene glycol immobilized on Sepharose. **J. Chromatogr. A**, v. 734, p. 213-219, 1996.

REISER, R. Oversimplification of diet: coronary heart disease relationship and exaggerated diet recommendation. **The american journal of clinical nutrition**, v. 31, p. 865-867, 1978.

ROBINSON, S. D. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A. 1991.

ROMANOFF, A. L.; ROMANOFF, A. J. **The Avian Egg**. New York: John Wiley Sons, Inc. 1949.

RIPPEL, G.; SZEPESY, L. Hydrophobic interaction chromatography of proteins on an Alkyl-Superose column. **J. Chromatogr. A**, v. 664, p. 27-32. 1994.

SALVA, T. J. G. Tecnologia para redução de colesterol em alimentos: métodos enzimáticos. In : SEMINÁRIO "COLESTEROL: ANÁLISES, OCORRÊNCIA, REDUÇÃO EM ALIMENTOS E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE" Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada. Ital, 1996, p.7-13.

SANTOS, G.F. **Influência dos parâmetros de extração do sistema gema desidratada - acetona, sobre as características químicas e funcionais da gema com baixo teor de colesterol.** Rio de Janeiro: UFRRJ, 1999. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SECRETARIA DE INSPEÇÃO DE PRODUTO ANIMAL (SIPA) **Portaria** N° 01, de 21 de fevereiro de 1990, Brasil.

SGARBIERI, V. **Proteínas em alimentos protéicos.** Propriedades. Degradações . modificações. São Paulo -SP: Ed Livraria Valeria. 1996.

SHIMADA, K. AND MATSUSHITA, S. Thermal coagulation of egg albumen. **J. Agri. Food Chem.** v. 23, p. 196-199, 1980.

SION, B., GRIZARD, G.; BOUCHER, D. Quantitative analysis of desmosterol, cholesterol and cholesterol sulfate in semen by high-performance liquid chromatography. **J. Cromatogr. A**, v. 935, p. 259-265, 2001.

SMITH, L. L. **Cholesterol autooxidation.** London: Plenum Press. 1981.

SURAI, P. F.; SPARKS, N. H. C. Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, p. 7-16, 2000.

STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. **Egg Science and Technology.** 3 ed. Wesport: AVI Publisher company, 1995. 449p.

STROP, P.; CECHOVA', D.; TOMA' SEK, V. Model study of hydrophobic interactions of a- and b-trypsin and a-chymotrypsin. **J. Chromatogr. A**, v. 259, p. 255-268, 1983.

TOMAZ, C. T.; QUEIROZ, J. A. Studies on the chromatographic fractionation of *Trichoderma reesei* cellulases by hydrophobic interaction. **J. Chromatogr. A** v. 865, p. 123-128, 1999.

TSAI, L. S.; HUDSON, C. A. Cholesterol oxides in commercial dry egg products: isolation and identification. **J. Food Sci.**, v. 49, p. 1245-1248, 1984.

VACHIER M. C.; PIOT M.; AWADE A. C. Isolation of hen egg white lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin, using a quarternaty ammonium bound to a highly crosslinked agarose matrix. **J. Cromatogr. B**, v. 664, p. 201-210, 1995.

VAILAYA, A.; HORVATH, C. Retention thermodynamics in hydrophobic interaction chromatography. **Ind. Eng Chem. Res.**, v. 35, p. 2964-2981, 1996.

WANKAT, P. C., **Large Scale Adsorption and Chromatography**, Boca Raton: FL, CRC Press, 1986.

WENK, S.-O.; KRUIP, J. Novel, rapid purification of the membrane protein photosystem I by high-performance liquid chromatography on porous materials. **J. Chromatogr. B** v. 737, p. 131–142 2000.

WILLIAMS III O. R.; VORAPANN M.; MONGKOL S. Characterization of na inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 46, p. 355-360, 1998.

YANG, S. C.; BALDWIN, R. E. Functional properties of eggs in foods. In **Egg Science and Technology** (Stadelman, W. J.; Cotterill, O. J. (eds.). New York: The Haworth Press. 1995, p. 405-450.

YANG, F.; ZHU, D.-W.; WANG, J.-Y.; LIN, S.-X. Rapid purification yielding highly active 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: application of hydrophobic interaction and affinity fast protein liquid chromatography. **J. Chromatogr. Biomed. Appl.** v. 582, p. 71–76, 1992.

YOON H. T.; KIM I. H. Phosphatidylcholine isolation from egg yolk phospholipids by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 949, p. 209-216, 2002.

CAPÍTULO 2

REDUÇÃO DO TEOR DE COLESTEROL DA GEMA DE OVO UTILIZANDO PECTINA

Redução do teor de colesterol da gema de ovo utilizando pectina

Resumo

A otimização do processo de redução de teor do colesterol da gema de ovo líquida *in natura* usando pectina de alto teor de grupos metoxila foi conduzida empregando-se a metodologia de superfície de resposta, com o intuito de definir o nível de máxima extração de colesterol para uma mínima diminuição do conteúdo protéico da gema. As variáveis que mais influenciaram o processo foram o nível de diluição da gema, a força iônica e o pH da suspensão da gema, bem como a quantidade do gel de pectina utilizada na extração. O fatorial fracionário 2^{4-1}_{III} foi empregado no planejamento composto central, para determinação do número mínimo de experimentos a realizar. As condições ótimas do processo foram 5 g de gema para 31,23 g de água, força iônica de 0,39 M e pH igual a 9,2 para a suspensão da gema e 5,78 g de gel de pectina com 3% (m/m) de pectina. Observaram-se na gema uma queda de 85,6% no teor de colesterol e uma diminuição de 11,4% no conteúdo protéico.

1. Introdução

O colesterol está presente na gema do ovo em quantidades variáveis (180 a 250 mg), dependendo do genótipo das aves (STADELMAN e COTTERIL, 1995). No entanto, o colesterol quando exposto ao ar, à temperatura ambiente, é suscetível à oxidação, podendo gerar mais de 60 diferentes sub-produtos, os chamados óxidos de colesterol (Razzazi-Fazeli et al., 2000). Estudos toxicológicos evidenciaram que esses óxidos exercem ações mutagênicas, citogênicas e carcinogênicas, estando envolvidos na iniciação e propagação de várias doenças, como câncer, aterosclerose e distúrbios cardiovasculares (MISSLER, 1985; JOHNSON, 1996), o que leva o consumidor a adquirir no mercado alimentos mais saudáveis, com baixas concentrações ou isentos de colesterol. A demanda por esses tipos de produtos motivou as indústrias de alimentos e farmacêutica a desenvolver alimentos com as características desejadas, por exemplo gema de ovo com teores de gordura e de colesterol reduzidos (SMITH et al., 1995). Para tanto, diferentes processos de extração ou diminuição do conteúdo de colesterol da gema foram testados, como a extração com solventes

orgânicos (MARTUCCI e BORGES, 1997; CHUNG e FERRIER, 1991; KWAN et al., 1991); com fluido supercrítico (FRONING et al, 1990; OGASAHARA et al., 1992); com óleos vegetais (CONTE et al., 1992); com a biotransformação do colesterol por ação de enzimas (CHENFENG et al., 2002; WATANABE et al, 1986); com a complexação do colesterol, empregando-se β -ciclodextrinas (SMITH et al., 1995; SHUKLA, 1991), saponinas de *Quiluaia Saponaria* (BRUNHARA, 1997; SUNDFELD et al., 1993) e com goma-arábica (HSIEH et al., 1994).

A goma-arábica foi empregada na extração de colesterol partindo-se de propriedades de polissacarídeos aniônicos com baixos valores de pH, que podem ser usados como agentes quelantes formando complexos insolúveis (lipoproteína-agente quelante) em água e que são fáceis de remover. No entanto, uma limitação desse processo é a elevada perda de proteínas, superior a 66%, que, juntamente com os lipídios, são responsáveis pelas propriedades emulsificantes da gema. Segundo LEWIS (1993), os polissacarídeos são hidrocolóides que conferem maior viscosidade e consistência gelatinosa aos alimentos aos quais são adicionados, pois contêm grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que favorecem suas propriedades emulsificantes. Os principais polissacarídeos empregados na indústria de alimentos são alginato, xantana, ágar, carragena, goma-arábica e pectina.

A pectina é um polissacarídeo natural presente em quase todas as plantas terrestres e responsável por propriedades estruturais de frutas e vegetais (ROLLER e JONES, 1996). É geralmente extraída de frutas cítricas e maçãs. O componente majoritário da pectina é o ácido galacturônico parcialmente esterificado com um grupo metoxila. As pectinas podem ser classificadas de acordo com o grau de esterificação (GE): as que possuem GE superior a 50% são as pectinas de alta metoxilação e as com GE inferior a 50%, as de baixa metoxilação (WONG, 1989).

Uma propriedade funcional importante desse biopolímero é a sua capacidade de formar géis em soluções aquosas (YOKOI et al., 2002). O géis formados por pectinas de alta metoxilação (PAM) possuem grande quantidade de grupos estermetílicos (COOCH_3), cujas interações hidrofóbicas sustentam a estrutura do gel (OAKENFULL e SCOTT, 1984). Pectinas são amplamente usadas como ingrediente na indústria de alimentos, como na produção de geléias, sucos de frutas e artigos de confeitaria, na fabricação de filmes biodegradáveis comestíveis (COFFIN e FISHMAN, 1997; FISHMAN e COFFIN, 1995),

na separação de proteínas (YANG et al., 1998) e de enantiômeros (PHINNEY et al., 1999) e na a redução dos níveis de colesterol do sangue humano (DAY et al., 1989; JUDD e TRUSWELL, 1982).

Assim, neste trabalho foi avaliado o emprego de pectina de alta metoxilação, visando reduzir o teor de colesterol da gema de ovo. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada na otimização do processo extrativo do colesterol. Buscou-se também minimizar o arraste das proteínas durante a extração.

2. Material e métodos

2.1. Material

Os ovos frescos para a obtenção da gema *in natura* foram adquiridos no mercado local de Viçosa, MG (Brasil), sendo a quebra dos ovos e a separação da gema e da clara manuais. A pectina GENU[®] tipo 104 (GE>69%) foi obtida da CP Kelco Brasil S.A. (São Paulo, Brasil). O gel de pectina foi preparado como uma solução aquosa 3% em massa de pectina. Os padrões de colesterol e albumina de soro bovino (BSA) foram adquiridos da Sigma Chemicals (St. Louis, USA). Os reagentes empregados foram de grau HPLC e para análise.

2.2. Processo extrativo

A extração de colesterol envolveu as seguintes etapas: 1) pesagem de 5 g de gema (Denver Analytical Balance, M310, USA) e posterior diluição em solução salina (NaCl), em uma relação gema: solução salina pré-definida; 2) ajuste do pH para o valor desejado (Potenciômetro DM20, Digimed, Brasil) usando KOH 1 N; 3) mistura da suspensão de gema com o gel de pectina, em uma relação suspensão de gema: gel de pectina pré-estabelecida. Essa suspensão foi periodicamente agitada; 4) resfriamento a 4 °C por 30 min, em banho termostático (TE-184, Tecnal, Brasil); 5) centrifugação a 5000 x g por 10 min, a 4 °C (Ultracentrífuga Sorval RC-5B, USA); 6) separação do sobrenadante; e 7) quantificação do teor de colesterol no sobrenadante. Os experimentos foram conduzidos em tubos de centrífuga de 50 mL.

2.3. Estudos preliminares

Em testes preliminares foi avaliada a influência de cinco variáveis sobre a extração de colesterol. Essas variáveis foram a relação de diluição gema:água (X_1), a quantidade de gel de pectina (X_2), a força iônica da suspensão da gema (X_3), o pH da suspensão da gema (X_4) e o tempo de extração (X_5). Foi empregado o fatorial fracionário 2^{5-1}_V de resolução 5 (BOX e HUNTER, 1978) para cinco variáveis independentes com dois níveis cada uma (Tabela 1). Os dados experimentais foram analisados usando o pacote estatístico SAS[®] versão 8.0, procedimento STEPWISE (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Tabela 1 - Variáveis e respectivos níveis no estudo preliminar

Variável	Símbolo	Níveis	
		-1	+1
Diluição gema: água (g:g)	X_1	0,17	0,27
Quantidade de gel (g)	X_2	5,00	7,00
Força iônica (M)	X_3	0,20	0,50
pH	X_4	7,50	10,50
Tempo de extração (min)	X_5	20	60

2.4. Delineamento experimental

Na otimização do processo extrativo foi empregada a metodologia de superfície de resposta (MSR) para avaliar, simultaneamente, a influência das quatro variáveis pré-selecionadas sobre a extração do colesterol da gema de ovo com pectina. Os experimentos preliminares indicaram que quatro variáveis independentes deveriam ser analisadas: a relação de diluição gema:água (X_1), a quantidade de gel de pectina (X_2), a força iônica da suspensão de gema (X_3) e o pH da suspensão de gema (X_4), como apresentado na Tabela 2. As variáveis dependentes foram a porcentagem de redução de colesterol (Y_1) e a porcentagem de redução de proteína (Y_2). Na definição do planejamento composto central foi empregado o fatorial fracionário 2^{4-1}_{III} de resolução 3 (BOX e HUNTER, 1978; NETO et al., 2001), para quatro variáveis independentes com cinco níveis cada uma, oito pontos estrelas e quatro repetições no ponto central (Tabela 3). A região ótima da superfície foi obtida empregando-se o caminho de máxima inclinação (BOX e HUNTER, 1978; MYERS e MONTGOMERY, 1995). Este tipo de planejamento permitiu reduzir o número de experimentos para 20. As condições ótimas de cada variável no processo foram obtidas

pelo procedimento da otimização numérica (MYERS e MONTGOMERY, 1995) e por análise das superfícies de resposta.

Tabela 2 - Variáveis e respectivos níveis no planejamento composto central para redução do teor de colesterol na gema

Variável	Símbolo	Níveis de Variáveis Codificadas				
		-1,68	-1	0	+1	+1.68
Diluição gema: água (g:g)	X ₁	5:33,46	5:24,41	5:17,73	5:13,52	5:11,66
Quantidade de gel (g)	X ₂	4,32	5,00	6,00	7,00	7,68
Força iônica (M)	X ₃	0,10	0,20	0,35	0,50	0,60
pH	X ₄	6,50	7,50	9,00	10,50	11,50

2.5. Quantificação do colesterol

O colesterol presente na gema previamente saponificada (ZHANG et al., 1999; BRAGAGNOLO e RODRIGUEZ-AMAYA, 1993) foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O equipamento utilizado foi o Shimadzu (LC-10ADVP, Tokio, Japan) composto por uma bomba (LC-10ADVP), um auto-injetor (SIL-10ADVP) e um fotodetector de diodo (SPD-M10AVP) fixado a 208 nm. A separação foi conduzida, a 35 °C, em uma coluna de fase reversa C18 Shim-pack CLC-ODS (M)[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de partícula e 100 Å de poro de diâmetro, Shimadzu, Tokio, Japan) precedida por uma coluna de guarda do mesmo material (10 mm x 3,2 mm). O volume de injeção da amostra foi de 10 µL, sendo a fase móvel (isocrática) composta por uma mistura de isopropanol e acetonitrila (1:1) na vazão de 1,2 mL/min.

O método de padronização externa foi usado na análise, com as concentrações de colesterol variando de 0,02 a 1,0 mg/mL. Os dados experimentais foram correlacionados por análise de regressão linear.

2.6. Quantificação das proteínas

O teor de proteína foi determinado pelo método de Bradford (1976). Para 0,1 mL de gema diluída foram adicionados 5 mL de reagente de Bradford, sendo a solução resultante diluída para um volume final de 2 L. O reagente de Bradford forma um complexo de cor azul com as proteínas. Após 2 min de incubação, a absorbância foi lida a 595 nm. A curva analítica foi preparada com BSA em solução aquosa, contendo 0,15 M de NaCl, e em

concentrações que variaram de 10 a 100 µg de BSA/0,1 mL de solução. O reagente de Bradford foi preparado com 200 mg de azul de Coomassie Brilliant G-250 dissolvido em 100 mL de etanol 95% adicionados de 200 mL de ácido fosfórico 85%.

2.7. Análise estatística

Os dados experimentais foram analisadas usando o pacote estatístico SAS[®] versão 8.0, procedimento RSREG (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A confiabilidade da equação do modelo polinomial obtido foi avaliada utilizando o coeficiente de determinação R^2 , o resultado das análises de variância (ANOVA) e o nível de significância estatístico pelo teste de Fisher (F). O nível de significância dos coeficientes da regressão foi obtido pelo teste de Student (t).

Tabela 3. Dados experimentais para o processo de otimização

Teste	Variáveis				Resposta*	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y ₁	Y ₂
1	-1	-1	-1	+1	75,61	24,49
2	+1	-1	-1	-1	83,45	75,44
3	-1	+1	-1	-1	87,96	71,94
4	+1	+1	-1	+1	96,36	72,22
5	-1	-1	+1	+1	77,20	26,61
6	+1	-1	+1	-1	75,23	42,13
7	-1	+1	+1	-1	81,46	28,23
8	+1	+1	+1	+1	74,46	33,80
9	0	0	0	0	73,09	53,06
10	0	0	0	0	72,73	55,69
11	0	0	0	0	72,11	54,47
12	0	0	0	0	74,43	52,17
13	-1,68	0	0	0	82,31	15,37
14	1,68	0	0	0	59,19	64,42
15	0	-1,68	0	0	76,96	47,18
16	0	1,68	0	0	75,18	67,27
17	0	0	-1,68	0	90,17	77,73
18	0	0	1,68	0	77,44	33,70
19	0	0	0	-1,68	86,07	60,52
20	0	0	0	1,68	82,89	37,57

*Média.

3. Resultados e discussão

3.1. Estudo preliminar

Os testes preliminares de redução do teor de colesterol da gema definiram as variáveis que mais afetaram a extração do colesterol como X_1 , X_2 , X_3 , X_4 . A variável X_5 não foi considerada pela falta de significância no teste F ($> 0,1$). Provavelmente, o tempo de extração pouco influencia na estabilização das interações hidrofóbicas dos polímeros (OAKENFULL e SCOTT, 1984). Comportamento semelhante foi relatado por SMITH et al. (1995) após avaliarem o impacto do tempo de extração sobre a redução do teor de colesterol da gema por complexação com β -ciclodextrina. O tempo de extração foi então fixado em 30 min nos experimentos posteriores.

3.2. Redução do teor de colesterol

O resultado da análise de variância da regressão da variável resposta redução do teor de colesterol apresentado na Tabela 4, indica que o modelo de segunda ordem é significativo, com o valor de $F = 19,71$ e com um baixo valor de probabilidade [$(P_{\text{model}} > F) = 0,0001$]. O bom ajuste do modelo aos dados experimentais também pode ser verificado pelo valor do desvio médio absoluto (DMA) inferior a 2,5% (Equação 1), como pode ser observado na Figura 1, de análise de resíduos ($R^2=0,93$). O baixo valor do coeficiente de variação ($CV = 3,62\%$) também indicou uma maior confiança e precisão dos experimentos (BOX et al., 1978; ELIBOL, 2003).

$$DMA = \left[\sum_{i=1}^m \left(\frac{|\delta_{\text{exp},i} - \delta_{\text{cal},i}|}{\eta_{\text{exp},i}} \right) \right] \times \frac{100}{m} \quad (1)$$

em que $\delta_{\text{exp},i}$ e $\delta_{\text{cal},i}$ são os valores experimentais e calculados, respectivamente, e m é o número de pontos experimentais.

Na Tabela 5 são apresentadas as estimativas de cada parâmetro do modelo de segunda ordem, além do valor t do teste de Student e do valor da probabilidade (Pr) de cada parâmetro. Segundo BOX et al. (1978), altos valores de t e baixos de Pr levam a uma significância maior dos parâmetros estudados.

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) da variável resposta redução do teor de colesterol (modelo quadrático)

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor -F	Pr > F
Modelo	2275,665	14	162,5	19,71	<0,0001
Resíduo (erro)	173,193	21	8,247		
Falta de ajuste	2,753	2	1,376	0,15	0,8588
Erro puro	170,44	19	8,970		
Total	2448,858	35			

Tabela 5 - Parâmetros estimados do modelo de segunda ordem

Parâmetro	Estimativa	Valor t	Pr > t
Intercepto	72,945	56,37	< 0,0001
X ₁	-6,878	-8,05	< 0,0001
X ₂	-0,529	-0,62	0,5420
X ₃	-4,136	-7,52	< 0,0001
X ₄	-0,948	-1,11	0,2799
X ₁ ·X ₁	-0,737	-1,24	0,2272
X ₂ ·X ₁	0,392	0,35	0,7292
X ₂ ·X ₂	1,151	1,94	0,0657
X ₃ ·X ₁	-3,150	-4,39	0,0003
X ₃ ·X ₂	-2,720	-3,79	0,0011
X ₃ ·X ₃	3,891	6,56	< 0,0001
X ₄ ·X ₁	4,121	3,69	0,0014
X ₄ ·X ₂	7,784	6,97	< 0,0001
X ₄ ·X ₃	-0,702	-0,98	0,3390
X ₄ ·X ₄	4,129	6,97	< 0,0001

Os variáveis que resultaram altamente significativas (Pr < 0,0001) no processo de redução do teor de colesterol foram a relação de diluição gema: água e força iônica da suspensão. Assim maior redução no teor de colesterol ocorrerá com a diminuição da força iônica e com o aumento da diluição da gema (Figura 2). A maior diluição da gema em água diminui a viscosidade do sistema e favorece a formação dos complexos pectina-colesterol, levando a uma queda maior do teor de colesterol. SMITH et al. (1995) e HESIEH et al. (1994) relataram um comportamento semelhante ao empregarem, respectivamente, β-ciclodextrina e goma-arábica na extração do colesterol. Entretanto, maiores valores de diluição podem diminuir o rendimento, com conseqüentes perdas econômicas.

A elevação da força iônica na suspensão da gema leva a uma exposição dos aminoácidos hidrofóbicos das proteínas (JANSON e RYDÉN, 1998), o que favorece a interação hidrofóbica das proteínas da gema com os grupos estermetílicos da pectina e diminui, provavelmente, a formação dos complexos pectina-colesterol. Entretanto, baixas forças iônicas favorecem a solubilidade dessas proteínas (CAUSERET et al., 1991).

Na Figura 3, observa-se maior redução do teor de colesterol com o aumento da quantidade de gel de pectina e abaixamento da força iônica. Como o gel de PAM caracteriza-se pela presença de grupos hidrofóbicos estermetílicos (WONG, 1989), a elevação do número destes grupos hidrofóbicos favorecerá a formação de complexo pectina-colesterol. Embora a pectina possa ser utilizada como substituta de gorduras na indústria de alimentos, como no caso da maionese, com substituição de até 1,2% do conteúdo total do produto, é importante não alterar as características físico-químicas da gema (ROLLER e JONES, 1996).

A diminuição no valor do pH e a elevação da diluição favorecem a redução do teor de colesterol, como apresentado na Figura 4. Decréscimo no pH resulta em aparente aumento das interações hidrofóbicas (JANSON e RYDÉN, 1998; PHARMACIA, 1993). No entanto, em valores de pH baixos (5,0 a 7,0), a pectina comporta-se como um polissacarídeo aniônico que produz complexos insolúveis em água com outras moléculas carregadas positivamente como metais, proteínas e lipoproteínas (HSIEH et al., 1994; LEWIS, 1993). Comportamento esse desfavorável no processo estudado.

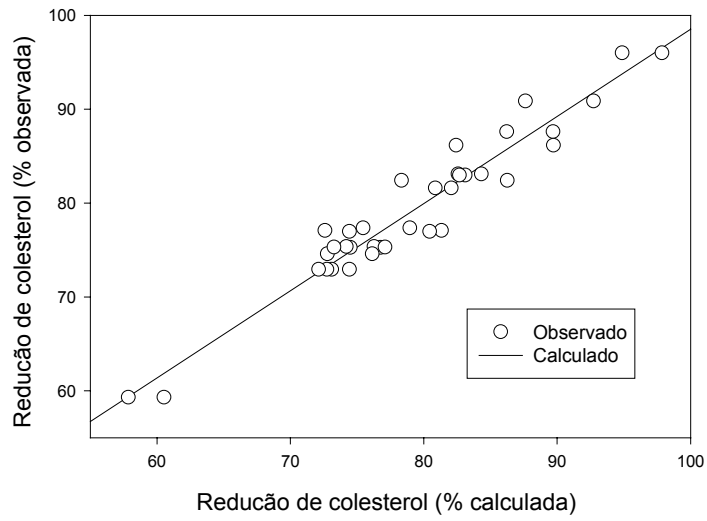


Figura 1 - Análise de resíduos para a redução do teor de colesterol.

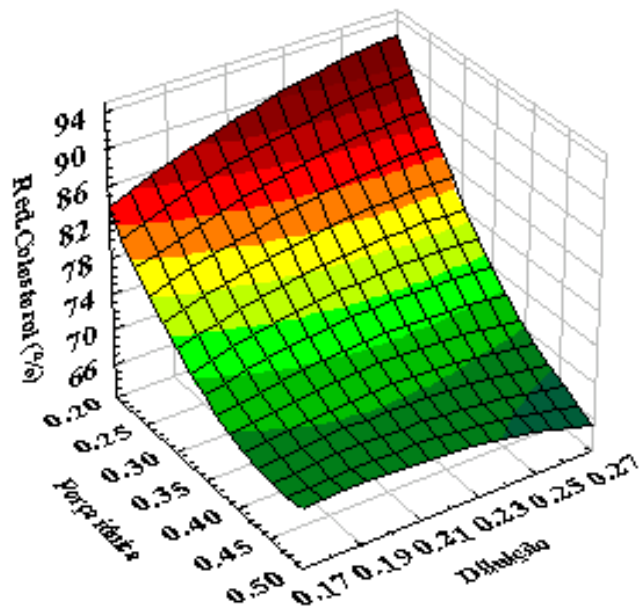


Figura 2 - Influência da relação de diluição e da força iônica sobre a redução do teor de colesterol.

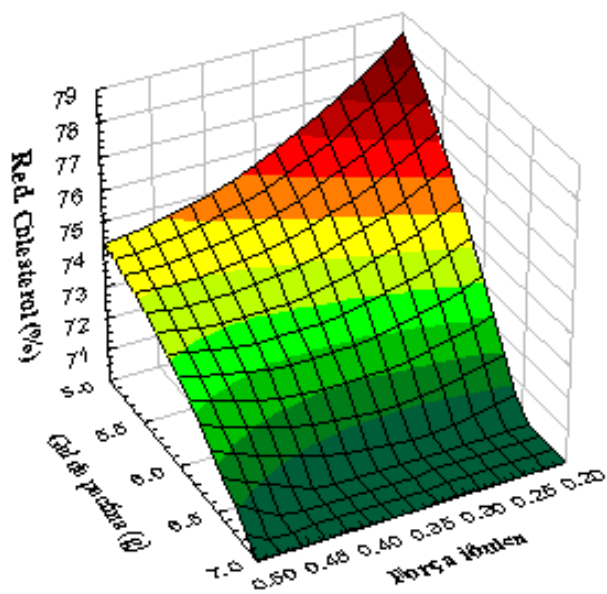


Figura 3 - Influência da quantidade de gel de pectina e da força iônica sobre a redução do teor de colesterol.

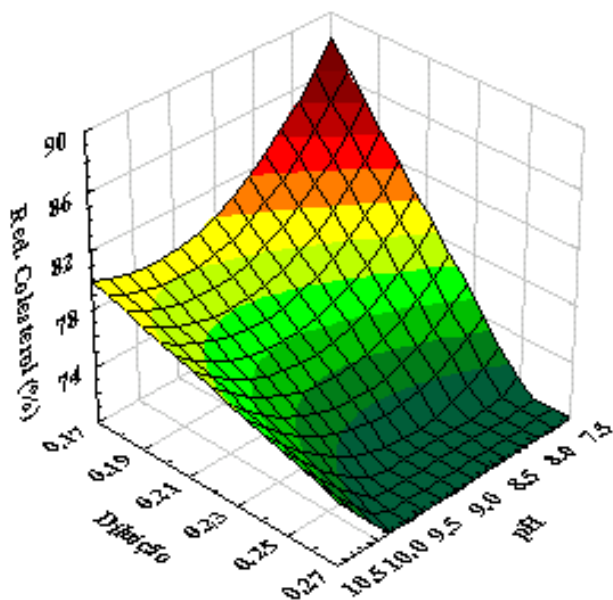


Figura 4 - Influência da relação de diluição e do pH sobre a redução do teor de colesterol.

3.3. Redução do conteúdo protéico

Os resultados da análise de variância (ANOVA) da regressão da variável resposta redução do conteúdo protéico da gema estão listados na Tabela 6, em que se observa que o modelo de segunda ordem, é altamente significativo, de acordo com o valor de F , igual a 43,77, com baixo valor de probabilidade [$(P_{\text{modelo}} > F) = 0,0001$]. O bom ajuste do modelo aos dados experimentais pode ser avaliado pelo desvio médio absoluto, inferior a 7,5%, e pelo comportamento observado na Figura 5, de análise residual com $R^2 = 0,97$. O coeficiente de variação foi de 9,45%. Na Tabela 7 são apresentadas as estimativas de cada parâmetro do modelo de segunda ordem, além do valor de t do teste de Student e do valor da probabilidade (Pr) de cada parâmetro.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) da variável resposta redução do conteúdo protéico da gema (modelo quadrático)

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor -F	Pr > F
Modelo	13278	14	948,429	43,77	<0,0001
Resíduo (erro)	455,008	21	21,667		
Falta de ajuste	28,032	2	14,016	0,620	0,547
Erro puro	426,976	19	22,473		
Total	13733,088	35			

Tabela 7 - Parâmetros estimados do modelo de segunda ordem

Parâmetro	Estimativa	Valor t	Pr > t
Intercepto	54,836	26,15	< 0,0001
X_1	14,597	10,54	< 0,0001
X_2	5,979	4,32	0,0003
X_3	-13,733	-15,41	< 0,0001
X_4	-6,830	-4,93	< 0,0001
$X_1 \cdot X_1$	-5,592	-5,82	< 0,0001
$X_2 \cdot X_1$	-0,748	-0,41	0,6836
$X_2 \cdot X_2$	0,549	0,57	0,5736
$X_3 \cdot X_1$	-3,768	-3,24	0,0039
$X_3 \cdot X_2$	-6,369	-5,47	< 0,0001
$X_3 \cdot X_3$	0,005	0,01	0,9956
$X_4 \cdot X_1$	-1,289	-0,71	0,4838
$X_4 \cdot X_2$	-5,556	-3,07	0,0058
$X_4 \cdot X_3$	5,091	4,37	0,0003
$X_4 \cdot X_4$	-2,351	-2,45	0,0233

Na Figura 6, observa-se que uma maior diluição e uma menor força iônica reduzem a perda do conteúdo protéico em razão, provavelmente, de uma elevação da solubilidade da proteína. De acordo com WONG (1989), baixas concentrações de sal tendem a aumentar a solubilidade da maioria das proteínas. Assim, em um meio aquoso, os grupos hidrofóbicos das proteínas tendem a repelir as moléculas de água, agrupando-se nas regiões da molécula protéica mais distantes da sua superfície.

Outra característica é o favorecimento da protonação das proteínas em baixos valores de pH (WONG, 1989), levando ao aparecimento de interações eletrostáticas entre a proteína e outro componente presente no meio, um polímero, por exemplo (DOUBLIER et al., 2000). MAROZIENE e KRUIF (2000) conduziram a adsorção da caseína empregando PAM em pH 5,3 e a desorveram com o aumento do pH. Na Figura 7, verifica-se uma menor redução no conteúdo protéico com a elevação do pH, em um valor de força iônica fixo.

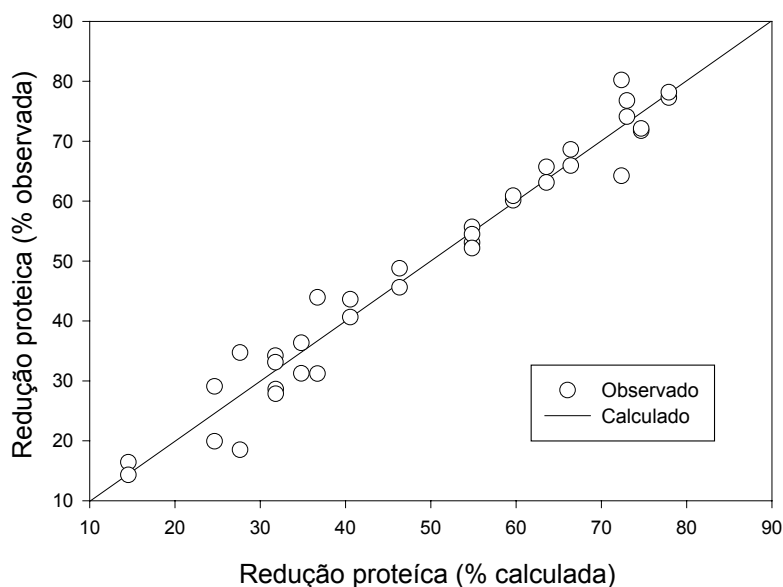


Figura 5 - Análise de resíduos para a redução do conteúdo protéico.

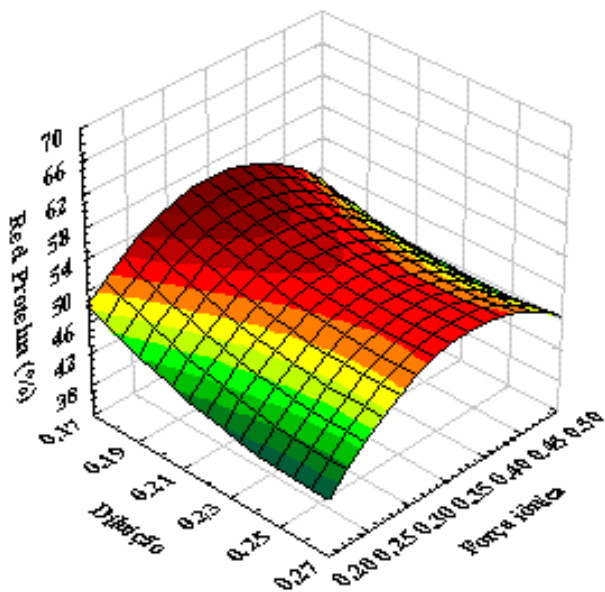


Figura 6 - Influência da relação de diluição e da força iônica sobre a redução do conteúdo protéico.

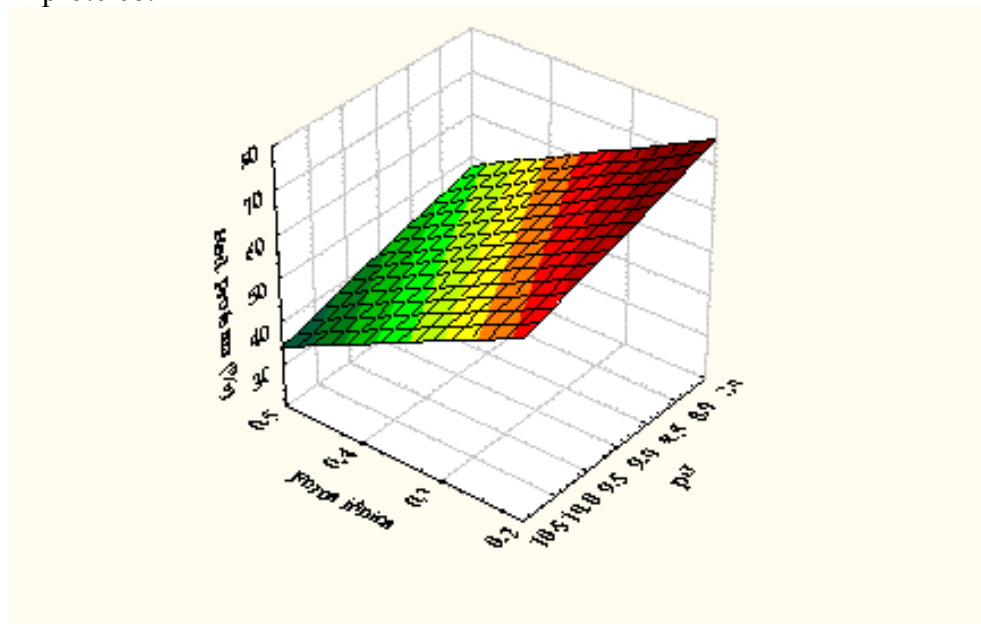


Figura 7 - Influência do pH e da força iônica sobre a redução do conteúdo protéico.

3.4. Otimização do processo extrativo

Esse processo foi otimizado usando o método do ponto máximo ou mínimo, como descrito por Myers e Montgomery (1995). A maximização da variável resposta redução do

teor de colesterol levou à seguinte equação de segunda ordem, considerando-se as variáveis mas significativas ($< 0,0001$) como apresentado na Tabela 5:

$$Y_1 = 72,945 - 6,878X_1 - 4,136X_3 + 3,891X_3^2 + 7,784X_4X_2 + 4,129X_4^2 \quad (2)$$

E a minimização da variável resposta redução do conteúdo protéico na gema levou a seguinte equação de segunda ordem considerando as variáveis mas significativas ($< 0,0001$), como apresentado na Tabela 7:

$$Y_2 = 54,836 + 14,597X_1 - 13,733X_3 - 6,830X_4 - 5,592X_1^2 - 6,369X_3X_2 \quad (3)$$

A Tabela 8 lista as condições ótimas para a maximização da redução do teor de colesterol. Observou-se, no presente trabalho, um alto valor de redução do teor de colesterol, de 98,94%. Embora a concomitante elevação da redução do conteúdo protéico da gema obtida (32,52%) seja prejudicial a esse processo.

Tabela 8 - Condições ótimas das variáveis codificadas e reais

Variável	X_1	X_2	X_3	X_4	Y_1 (Eq. 1)	Y_2 (Eq. 2)
Codificada	-0,727	-0,798	0,144	-1,279	98,94	32,52
Real	5:22,2	5,200	0,372	7,0		

Na Tabela 9 relacionam-se as condições ótimas de minimização da perda do conteúdo protéico, verificando-se que o aumento nos valores de diluição e do pH favorecem a solubilização da gema na fase aquosa. Os valores de pH e força iônica estão próximos aos obtidos por CAUSERET et al. (1991) para a solubilidade máxima das proteínas da gema.

O emprego dessas condições levou a valores de Y_1 e Y_2 de 85,65 e 11,38, respectivamente, validando, assim, o uso do modelo (Equação 3) para o processo extrativo do colesterol da gema.

No presente trabalho os valores de redução do conteúdo protéico na gema, em torno de 12%, foram inferiores aos do processo empregando goma-arábica e situaram-se próximos dos obtidos com β -ciclodextrina, como visto na Tabela 10. SMITH et al. (1995)

obtiveram menor perda de proteína, em torno de 9%, empregando β -ciclodextrina para a diminuição do teor de colesterol

Tabela 9 - Condições ótimas das variáveis codificadas e reais

Variáveis	X_1	X_2	X_3	X_4	Y_1 (Eq. 2)	Y_2 (Eq. 3)
Codificada	-1,635	-0,227	0,278	0,139	83,37	12,37
Real	5: 31,23	5,773	0,392	9,2		

Tabela 10. Comparação da eficiência na remoção do colesterol da gema de ovo com diferentes agentes extrativos

Agente Extrativo	Temperatura °C	Redução de Proteína (%)	Colesterol Removido (%)	Referências
Goma-arábica	21	75,0	94,0	Hsieh et al. (1994)**
β -ciclodextrina	50	9,2	89,2	Smith et al. (1995)
β -ciclodextrina*	N.R.	N.R.	90,0	Vollbrecht et al. (1991)**
Óleo (amendoim)	50	N.R.	89,3	Bracco e Viret (1982)**
Acetona	25	N.R.	91,0	Martucci e Borges (1997)
Pectina	25	11,3	85,7	Neste trabalho

*Empregando o plasma da gema

**Patentes

N.R. não relatado

4. Conclusões

- A metodologia de superfície de resposta mostrou-se uma técnica eficiente na otimização do processo de redução do teor de colesterol da gema de ovo líquida usando pectina de alto teor de grupos metoxila.
- O fatorial fracionário 2_{III}^{4-1} empregado no planejamento composto central mostrou-se adequado para explicar os efeitos das quatro variáveis mas significativas (nível de diluição da gema, força iônica e pH da suspensão da gema e quantidade do gel de pectina utilizada para a extração) no processo com um mínimo número de experimentos.
- As condições ótimas do processo foram 5 g de gema para 31,23 g de água, força iônica de 0,39 M e pH igual a 9,2 para a suspensão da gema e 5,77 g de gel de pectina com 3% (m/m) de pectina.
- Uma redução de 83,4% no teor de colesterol e uma diminuição de 12,4% no conteúdo protéico foram observadas na gema.

5. Referencias Bibliografias

- BRACO, H.; VIRET J.-L.. **Decholesterization of egg-yolk**. U. S. Patent 4,333,959, 1982.
- BRAGAGNOLO N.; RODRIGUEZ-AMAYA D. B. Avaliação comparativa de três métodos para determinação de colesterol em gema de ovo. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 36, n. 2, p. 237-251, 1993.
- BRUNHARA, S. S. **Otimização do processo de extração de colesterol do óleo de manteiga utilizando extrato *Quiluaia saponaria***. Campinas, SP: UNICAMP, 1997, 89 f. Dissertação (Mestrado).
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER J. S. **Statistic for experimenters**. New York: John Wiley and Sons, 1978.
- CAUSARET, D.; MATRINGE, E.; LORIET, D. Ionic strength and pH effects on composition and microstructure of yolk granules **J. Food Sci.** v. 56, p. 1532- 1536. 1991.
- CHENFENG, L. V.; TANG, Y.; WANG, L.; WENMING, J. L.; CHEN, Y.; YANG, S.; WANG, W. Bioconversion of yolk cholesterol by extracellular cholesterol oxidase from *Brevibacterium sp.* **Food Chemistry**, v. 77, p. 457-463, 2002.
- CHUNG, S. L.; FERRIER, L. K. Partial lipid extraction of egg yolk powder: effects on emulsifying properties and soluble protein fraction. **J. Food Sci.** v. 56 , n. 5, p. 1255- 1258, 1991.
- COFFIN, D. R.; FISHMAN, M. L. **Films fabricated from mixtures of pectin and Poly(vinyl alcohol)** U. S. Patent 5,646,206, 1997.
- CONTE, Jr.; JHONSON, B. R.; HSIEH, R. J.; KO, S. S. **Method for removing cholesterol from eggs** U. S. Patent 5,091,203, 1992.
- DAY, C. E.; KUHRTS E. H. **Method and composition for reducing serum cholesterol**. U. S. Patent 4,824,672, 1989.
- DOUBLIER, J.-L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Current Opinion in colloid & Interface Science.**, v. 5, p. 202-214, 2000.
- FISHMAN, M. L.; COFFIN, D. R. **Films fabricated from mixtures pf pectin and starch**. U. S. Patent 5,451,673, 1995.
- FRONING, G. W.; WEHLING, R. L.; CUPPETT, S. L.; PIERCE, M. M.; NIEMANN, L.; SIEKMANK, D. K. Extraction of cholesterol and other lipids from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide. **J. Food Sci.**, v. 55, n. 1, p. 95-98, 1990.

HSIEH, R. J.; SNYDER, D.P; FORD, E..W. **Method for removing cholesterol and fat from egg yolk by chelation and reduced-cholesterol egg product.** U.S.Patent. 5,302,405, 1994.

JANSON, J.-C.; RYDÉN L. **Protein purification:** principles, high resolution methods and applications. New York: John Wiley & Sons. 1998.

JOHNSON, C. B. Isolation of Cholesterol Oxidation Products from Animal Fat Using Aminopropyl Solid-Phase Extrsaction, **J Chromatogr. A.** v. 736, p. 205-210, 1996.

JUDD, P. A.; TRUSWELL, A. S. Comparison of the effects of high and low methoxyl pectins on blood and faecal lipids in man. **Br. J. Nutri.** v. 48, p. 451-458, 1982.

KWAN, L. E.; HELBIG, L. N.; NAKAI, S. Fractionatin of water-soluble and Insoluble Components from egg yolk with minimum use of organic solvents. **J. Food Sci.**, v. 56, n. 6, p. 1537-1541., 1991.

LEWIS, M. J. **Propriedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado.** Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1993.

MARTUCCI, E. T.; BORGES, S. V. Extraction of cholesterol from dehydrated egg yolk with acetone: determination of the practical phase equilibrium and simulation of the extraction process. **J. Food Engineering**, v.32, p. 365-373, 1997.

MAROZIENE, A.; KRUIF, C. G. Interaction of pectin and casein micelles. **Food Hydrocoll.** v. 14, p. 391-394, 2000.

MISSLER, S. R.; WASILCHUCK, B. A; MERRITTT, J. R. Separation and Identification of Cholesterol Oxidation Products in Dried Egg Preparations, **J. Food Sci.** v. 50, p. 595-598. 1985.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments.** New York: John Wiley & Sons, 1995.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e industria.** Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2001.

OAKENFULL, D.; SCOTT, A. Hydrophobic interaction in the gelation of high methoxyl pectins. **J. Food Sci.** v. 49, p. 1093-1098, 1984.

OGASAHARA, J.; HARIU, H.; TAKAHASHI, M. **Process for producing liquid having cholesterol content.** U. S. Patent 5,116,628, 1992.

PHINNEY, K. W.; JINADU, L. A.; SANDER, L. C. Chiral selectors from fruit: application of citrus pectins to enantiomer separtions in capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A.** v. 857, p. 285-293, 1999.

RAZZAZI-FAZELI, E.; KLEINEISEN, S.; LUF., W. Determination of cholesterol oxides in processed food using high performance liquid chromatography - mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionisation, **J. Chromatogr. A.** v. 896, p. 321-334, 2000.

ROLLERS, S.; JONES, S.A. **Handbook of fat replacers.** New York: CRC Press Inc., 1996.

SAS Institute Inc. *SAS user's guide: Statistics*, Version 8 edition; Cary, North Carolina, 1999.

SHUKLA, T. P. Industrial research on cyclodextrins. **Cereal Foods World.** v. 36, p. 347-356, 1991.

SMITH, D. M.; AWAD, A.C.; BENNINK, M. R.; GILL, J. L. Cholesterol reduction in liquid egg yolk using β -Ciclodextrin. **J. Food Sci.** v. 60, n. 4, p. 691-694, 1995.

STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. **Egg Science and Technology.** 3^{ed}. Wesport: AVI Publisher Company, 1995, 449 p.

SUNDFELD, E.; YUN, S.; KROCHTA, J. M.; RICHARDSON, T. Separation of cholesterol from Butteroil using Quillaja Saponins: 1. Effects of pH, contact time and adsorbent. **J. Food Process engineering**, v. 16, p. 191-205, 1993.

VOLLBRECHT, H. R; CULLY, J.; WIESMULLER, J. **Process for the removal of cholesterol esters from egg yolk.** U. S. Patent 5,063,077, 1991.

WATANABE, A.; SHIMIZU, K.; AIHARA, H.; NAKAMURA, H.; SUZUKI, R.; KOMAGATA, K. Isolation and identificador of cholesterol-degrating Rhodococcus strains from food of animal origim and their cholesterol oxidadse activites. **J. General Applied Microbiology.** v. 32, p.137-147, 1986.

WONG, D. W. S. **Química de los alimentos: Mecanismos y teoria.** Zaragoza, Editorial Acribia S.A. 1995.

YANG, C. C.; CHEN, C. C.; CHANG, H. M. Separation of egg white lysosyme by anionic polysaccharides. **J. Food Sci.** v. 63, p. 962-965, 1998.

YOKOI, H.; OBITA, T.; HIROSE, J.; HAYASHI, S.; TAKASAKI, Y. Flocculation properties of pectin in various suspensions. **Bioresourse Technology.** v. 84, p. 287-290. 2002.

ZHANG, R.-Z.; LI, L.; LIU, S.-T.; CHEN, R.-M.; RAO, P.-F. An improved method of cholesterol determination in egg yolk by HPLC. **J. Food Biochemistry.** v. 23, p. 351-361, 1999.

CAPÍTULO 3

ADSORÇÃO DE COLESTEROL DO PLASMA DA GEMA DE OVO EM UM ADSORVENTE HIDROFÓBICO

Adsorção de colesterol do plasma da gema de ovo em um adsorvente hidrofóbico

Resumo

Dados de equilíbrio de adsorção hidrofóbica do colesterol presente no plasma da gema de ovo foram obtidos usando-se a resina Streamline Phenyl[®], em tanques agitados à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Foi avaliada a influência de dois tipos de sais (NaCl e Na₂SO₄) e de diferentes concentrações destes (0,0; 0,05; 0,1 e 0,2 M) sobre os dados de equilíbrio. O aumento da concentração de sal reduziu a quantidade de colesterol adsorvido na resina. Dois modelos de isotermas foram empregados para representar os dados de equilíbrio sólido-líquido, o de Langmuir e um modelo modificado com base na isoterma do tipo S. Este último levou a um melhor ajuste dos dados de equilíbrio, apresentando um valor de RSSE de 99,8%. Obteve-se uma redução de 70% do teor de colesterol presente no plasma com o uso de uma relação de diluição plasma:água de 1:4.

1. Introdução

Os lipídios e as proteínas são os maiores constituintes da gema. Ambas as frações têm importância particular no processamento da indústria de alimentos, na formulação de cosméticos e como componentes bioativos da indústria farmacêutica (KWAN et al., 1991; CARRILLO e KOKINI, 1988). A gema pode ser fracionada por centrifugação em duas partes, no plasma e em partículas sólidas granulares, sendo as lipoproteínas o maior constituinte de ambas as fases (KIOSSEOGLOU, 1989; BLACKWELDER e PIKE, 1990; LINDEN e LORIET, 1996). A fração do grânulo, além de colesterol, fosfolipídeos e triglicéridios, possui lipoproteínas de alta densidade (HDL), a lipovitelina e a fosfoproteína fosfovítina (BURLEY e COOK, 1989; BERLITZ e GROSCH, 1987). O plasma solúvel (em torno de 78% do total líquido da gema) é composto por lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A fração LDL contém cerca de 12% de proteínas e aproximadamente 80% de lipídios, dos quais 70% são lipídios neutros, 26% fosfolipídios e 4% colesterol livre (YOSHINORI e BERGOUGNOUX, 1998).

O colesterol está presente na gema do ovo em quantidades variáveis, de 180 a 250 mg por gema, dependendo do genótipo das aves (STADELMAN e COTTERIL, 1995). No

entanto o colesterol quando exposto ao ar, à temperatura ambiente, é suscetível à oxidação, podendo gerar mais de 60 diferentes subprodutos, os chamados óxidos de colesterol (RAZZAZI-FAZELI et al., 2000). Estudos toxicológicos têm evidenciado que os óxidos de colesterol exercem ações mutagênicas, citogênicas e carcinogênicas, estando envolvidos na iniciação e propagação de várias doenças, como câncer, arteriosclerose e distúrbios cardiovasculares (MISSLER, 1985; JOHNSON, 1996). Isso leva o consumidor a adquirir, no mercado, alimentos mais saudáveis, com baixas concentrações ou isentos de colesterol. Segundo SMITH et al. (1995), a demanda desses produtos tem motivado a indústria de alimentos e a farmacêutica ao desenvolvimento de novos processos para gerar alimentos com essas características, incluindo a gema de ovo com teores de gordura e colesterol reduzidos. Tais propostas incluem a extração do colesterol com solventes orgânicos (MARTUCCI e BORGES, 1997; CHUNG e FERRIER, 1991; KWAN et al., 1991); com fluido supercrítico (FRONING et al., 1990; OGASAHARA et al., 1992); com óleos vegetais (CONTE et al., 1992), com Saponinas de *Quiluaia Saponaria* (BRUNHARA S.S. 1997; SUNDFELD et al., 1993), com goma-arábica (HSIEH et al., 1994) e com a biotransformação do colesterol por ação de enzimas (CHENFENG et al., 2002; WATANABE et al., 1986).

Diante das dificuldades encontradas com os processos existentes, uma técnica com potencial de adequação à eliminação do colesterol da gema é a adsorção, na qual certos componentes de uma fase fluída são transferidos para a superfície de um adsorvente sólido, em um fenômeno de superfície. A adsorção por interação hidrofóbica foi aplicada, em grande escala, na eliminação do colesterol do plasma da gema de ovo por VOLLBRECHT et al. (1991).

O poder de fracionamento dos processos cromatográficos por adsorção (tanque agitado, leito fixo e leito fluidizado) transforma-os em uma técnica atrativa de separação molecular, macromolecular e de eliminação de substâncias contaminantes dos bioprodutos a purificar (LYDDIATT, 2002). A cromatografia por adsorção em tanque agitado ou batelada é um processo simples, em que a solução que contém o composto de interesse entra em contato direto com o adsorvente (LEVISON, 2000). Uma das vantagens do processo em batelada com relação ao leito fixo é que possibilita o processamento de um meio *in natura*, que não foi previamente clarificado, pré-concentrado ou pré-purificado

(LYDDIATT, 2002). Os tipos de adsorventes a usar no processo são dependentes da técnica cromatográfica selecionada como troca iônica, bioafinidade ou interação hidrofóbica.

A cromatografia por interação hidrofóbica (CIH) tem por fundamento as interações hidrofóbicas dos ligantes imobilizados na fase estacionária com as regiões não-polares dos solutos presentes em meios aquosos (ERIKSSON, 1998). Esse tipo de interação hidrofóbica é a base de diferentes estudos sobre a adsorção de colesterol da gema de ovo empregando-se β -ciclodextrina (CHIU et al. 2004; SMITH et al., 1995; SHUKLA, 1991).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a adsorção em tanques agitados do colesterol presente no plasma da gema, empregando-se uma resina de característica hidrofóbica, com variação da natureza química e da concentração de sal, além de estudar a influência da diluição do plasma em água sobre a redução do teor de colesterol.

2. Material e métodos

2.1. Material

Os ovos frescos foram adquiridos no mercado local de Vicoso, MG (Brasil). A obtenção da gema líquida, a quebra dos ovos e a separação da clara foram manuais. A resina empregada nos experimentos foi a Streamline Phenyl[®] (Amershan Pharmacia Biotech, Sweden), com densidade de 1,2 g/mL e tamanho de partícula de 100 a 300 μ m, sendo o padrão de colesterol adquirido da Sigma Chemicals (USA). Nos experimentos foram empregados água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore Inc., USA) e reagentes de grau HPLC ou analítico.

2.2. Obtenção do plasma da gema

O plasma da gema de ovo foi obtido após a diluição da gema líquida em tampão fosfato (20 mM, pH 7,0) na relação 1:1, em massa (Balança Analítica Denver, M310, USA). A suspensão foi misturada por 1 h em agitador magnético e centrifugada a 10.000 x g por 45 min, a 4 °C (Ultracentrifuga Sorval RC-5B, USA). O plasma (sobrenadante) foi então, separado dos grânulos (precipitado) e utilizado nos experimentos.

2.3. Quantificação do teor de colesterol

O colesterol presente no plasma da gema previamente saponificado (ZHANG et al., 1999; BRAGAGNOLO e RODRIGUEZ-AMAYA, 1993) foi quantificado usando o sistema cromatográfico Shimadzu LC-10ADVP (Japan), composto por uma bomba (LC-10ADVP), um injetor automático (SIL-10ADVP) e um fotodetector de diodo (SPD-M10AVP) a 208 nm. A separação foi realizada usando-se uma coluna de fase reversa C18 Shim-pack CLC-ODS (M)[®] (250 mm x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de partícula e 100 Å de diâmetro de poro, Shimadzu, Tokio, Japan), precedida por uma coluna de guarda do mesmo material (10 mm x 3,2 mm) a 35 °C e com volume de injeção da amostra de 10 µL. A fase móvel (isocrática) foi composta por uma mistura de isopropanol e acetonitrila (1:1), na vazão de 1,2 mL/min, utilizado-se o método de padronização externa. As concentrações de colesterol usadas foram de 0,02 a 1,0 mg/mL e os dados experimentais, correlacionados por análise de regressão linear.

2.4. Experimentos de adsorção

Os dados de equilíbrio da adsorção do colesterol do plasma foram determinados a partir da adição de 0,2 g do adsorvente (resina Streamline Phenyl[®]) a 1,5 mL de uma solução aquosa de tampão fosfato (20 mM e pH 7,0) contendo o sal avaliado (NaCl ou Na₂SO₄) em concentrações de sal pré-definidas (0; 0,05; 0,1 e 0,2 M). Após 8 h, a solução tampão foi separada da resina e a esta resina equilibrada foi adicionado 1,5 mL de plasma contendo o sal avaliado nas concentrações pré-definidas (CHEN e SUN, 2003; ZHANG e SUN, 2002). A faixa de concentração de colesterol no plasma variou entre (0 e 10) mg/mL. A mistura foi agitada por 8 h, a 25 ± 2 °C, utilizando-se o dispositivo para simular um tanque agitado proposto por FERREIRA (2001) e PEREIRA (1999). A seguir, o teor de colesterol do sobrenadante foi quantificado por cromatografia líquida de fase reversa (CLAE-FR). A quantidade de massa de colesterol absorvida foi calculada por balanço de massa.

2.5. Remoção do teor de colesterol do plasma

Na remoção do colesterol do plasma foram misturado 12 g de adsorvente com 50 mL de plasma diluído em tampão fosfato (20 mM e pH 7,0), nas relações de 1:0, 1:2 e 1:4

plasma:tampão. A adsorção foi conduzida sob agitação, a 25 ± 2 °C (FERREIRA, 2001; PEREIRA, 1999). Em intervalos de tempo determinados foram tomadas amostras de 0,1 mL e quantificado o teor de colesterol no sobrenadante.

3. Resultados e discussão

3.1. Experimentos de adsorção

Os dados de equilíbrio de adsorção do colesterol em diferentes concentrações dos dois tipos de sais avaliados são apresentados nas Figuras 1 a 4, em que se observa uma tendência geral de redução na adsorção de colesterol com o aumento da concentração de sal. Tal comportamento opõe-se àquele normalmente apresentado por proteínas na CIH, em que a adsorção tende a aumentar com a elevação do teor de sal na fase móvel. Nesses casos, a proteína é eluída com a redução da concentração de sal no eluente (MELANDER et al., 1984; FAUSNAUGH e REGNIER, 1986). O comportamento apresentado pelo colesterol, deveu-se, provavelmente, à competição das proteínas pelos grupos hidrofóbicos do adsorvente. Isto porque o aumento de sal no sistema produz maior exposição dos aminoácidos hidrofóbicos das proteínas presentes no plasma, favorecendo, assim, as interações hidrofóbicas entre as proteínas e o adsorvente e, conseqüentemente, a diminuição da adsorção do colesterol.

Dois modelos de isotermas foram empregados para ajuste dos dados experimentais, o modelo de Langmuir (Eq. 1) e o modelo proposto neste trabalho (Eq. 2). Este segundo modelo proposto tem como base a isoterma do tipo S descrita por GILES et al. (1960).

$$Q = \frac{q_m \cdot C_p}{k_d + C_p} \quad (1)$$

em que Q , é a quantidade de colesterol adsorvido por unidade de massa de adsorvente (mg/g); C_p , a concentração de colesterol na fase líquida, no equilíbrio (mg/mL); q_m , a quantidade máxima de soluto adsorvida na fase líquida (mg/g); e k_d , a constante de dissociação que descreve o equilíbrio de adsorção (mg/mL).

$$Q = \frac{q_m}{1 + \left(\frac{C_p}{a}\right)^b} \quad (2)$$

sendo a e b parâmetros da equação.

Na Tabela 1 são listados os valores dos desvios-padrão (SD) e do somatório relativo dos quadrados dos erros (RSSE) calculados pelas Eqs (3) e (4), respectivamente. O RSSE avalia a qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais (TONG et al., 2003).

$$SD = \left[\frac{\sum_{i=1}^m (\delta_{\text{exp},i} - \delta_{\text{cal},i})^2}{(m - p)} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

$$RSSE = \left[\sum_{i=1}^m \left(\frac{(\delta_{\text{exp},i})^2 - (\delta_{\text{exp},i} - \delta_{\text{cal},i})^2}{\delta_{\text{exp},i}^2} \right) \right] \times \frac{100\%}{m} \quad (4)$$

em que $\delta_{\text{exp},i}$ e $\delta_{\text{cal},i}$ são, respectivamente, os valores experimentais e os calculados dos dados de equilíbrio de adsorção; m , o número de pontos experimentais; e p , o número de parâmetros ajustados.

Na Tabela 1, observa-se a superioridade do ajuste do modelo proposto (RSSE de 99,77%) aos dados experimentais, em comparação com a isoterma de Langmuir (RSSE de 97,13%), embora o modelo de Langmuir tenha sido utilizado em outros trabalhos para descrever o fenômeno de adsorção do colesterol (CHIU et al., 2004; KIM et al., 2001; PALIT e MOULIK, 2000).

A curvatura tipo S do modelo proposto (Figuras 2 e 4) indica um lento aumento da quantidade de colesterol adsorvido na fase inicial do processo. Segundo GILES et al. (1960) o perfil tipo S ocorre quando a molécula de soluto tem uma moderada atração intermolecular com o adsorvente e, ou, quando existe forte competição pelos sítios ativos do adsorvente entre as moléculas do soluto com moléculas do solvente ou de outros solutos.

O plasma da gema de ovo contém majoritariamente lipídios (72,6%) e proteínas (24,6%), constituídas por cerca de 40% de aminoácidos hidrofóbicos (ANTON et al., 2003; ANTON e GANDEMER, 1997). Embora a solubilidade dessas lipoproteínas no plasma seja superior a 80% (ANTON e GANDEMER, 1997), é provável que ao lado dos β -carotenos venham a competir com o colesterol pelos grupos hidrofóbicos (fenil) imobilizados na resina.

Neste trabalho, a capacidade máxima de adsorção de colesterol foi de 12,65 mg colesterol/g de resina com 0,0 M de concentração de sal na solução. Na Tabela 2, apresentam-se dados da literatura para a capacidade adsortiva de três adsorventes e para a resina Streamline Phenyl[®]. Observou-se elevada capacidade de adsorção do adsorvente empregado neste trabalho, embora a sua capacidade adsortiva possa ser limitada pelo tamanho do adsorvato. Posto que o colesterol tem massa molar (386,7 Da) maior que a do ligante (grupo fenil, 77 Da), é possível que uma mesma molécula de colesterol, pelo seu tamanho, impossibilite a ligação de outra molécula de colesterol em um sítio ativo vizinho ao qual está ligada. Esta obstrução ao acesso ao sítio ativo reduzirá o número de moléculas do grupo fenil, decrescendo o número de grupos fenil disponível para a adsorção e, conseqüentemente, diminuindo a capacidade de adsorção da resina. A densidade de ligantes imobilizados na resina também pode contribuir para a redução ou incremento da capacidade adsortiva da resina empregada. Assim, a Streamline Phenyl[®] possui cerca de 40 μmol de grupos de fenil/mL de resina (FÄRENMARK et al., 1999), menor que a densidade de ligantes empregados em outros adsorventes, como a β -ciclodextrina imobilizada em chitosana (CHIU et al, 2004).

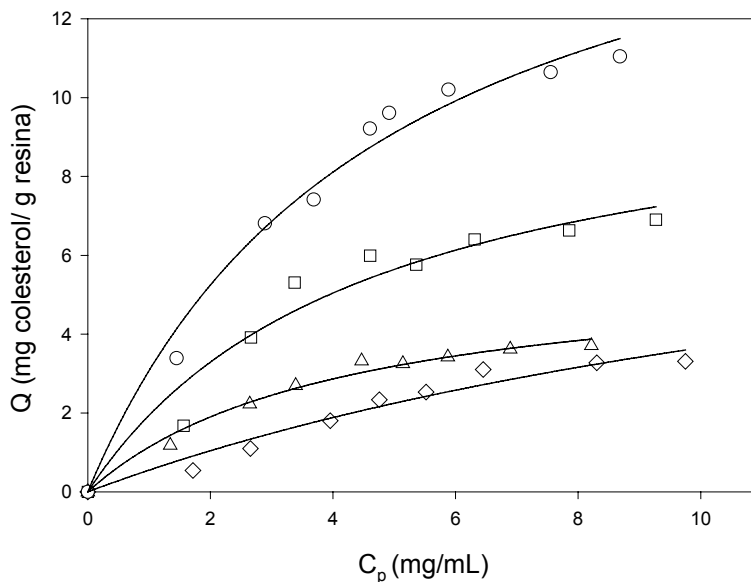


Figura 1 - Isotermas de adsorção do colesterol em NaCl: (o) 0,0 M; (\square) 0,05 M; (Δ) 0,1 M; (\diamond) 0,2 M e (—) modelo de Langmuir.

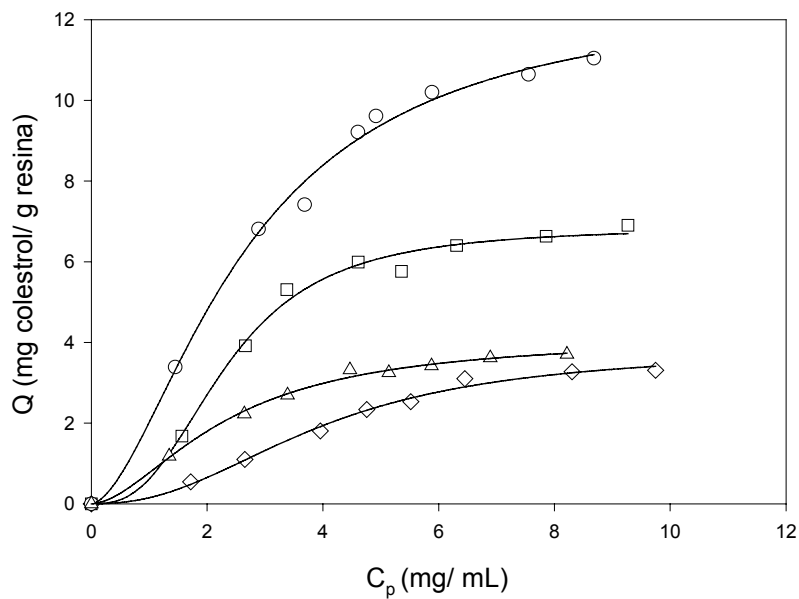


Figura 2 - Isothermas de adsorção do colesterol em NaCl: (o) 0,0 M; (□) 0,05 M; (Δ) 0,1 M; (◇) 0,2 M e (—) modelo proposto.

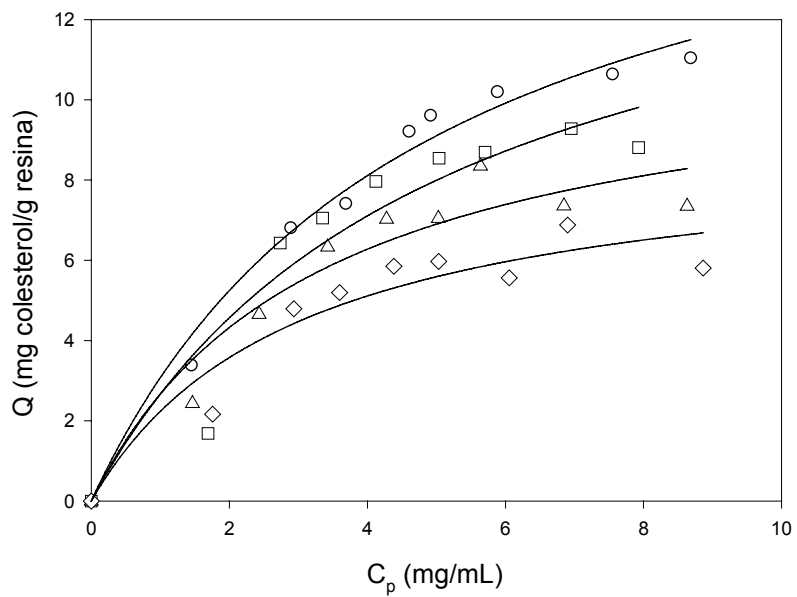


Figura 3 - Isothermas de adsorção do colesterol em de Na₂SO₄: (o) 0,0 M; (□) 0,05 M; (Δ) 0,1 M; (◇) 0,2 M e (—) modelo de Langmuir.

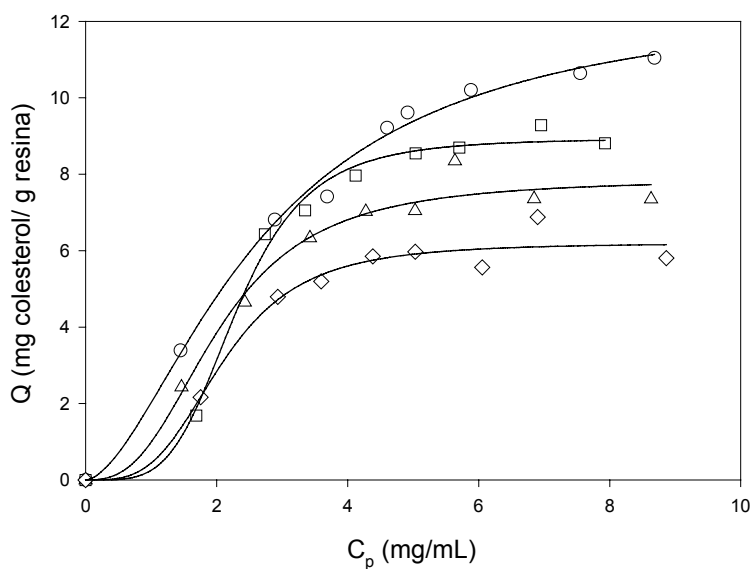


Figura 4 - Isotermas de adsorção do colesterol em Na_2SO_4 : (o) 0,0 M; (\square) 0,05 M; (Δ) 0,1 M; (\diamond) 0,2 M e (—) modelo proposto.

Tabela 1 - Ajuste dos dados de equilíbrio de adsorção do colesterol

NaCl (M)	Modelos de Isotermas			
	Langmuir		Proposto	
	SD	RSSE (%)	SD	RSSE(%)
0,00	0,4872	99,2433	0,2976	99,8917
0,05	0,5566	94,4201	0,2407	99,8592
0,10	0,1626	99,3041	0,1172	99,7181
0,20	0,2582	93,3505	0,1125	99,7101
Média		96,5795		99,79478
Na_2SO_4				
0,00	0,4872	99,2433	0,2977	99,8916
0,05	1,0964	98,9114	0,3185	99,6972
0,10	0,7635	96,8317	0,4448	99,7068
0,20	0,6885	95,8004	0,4099	99,6789
Média		97,6967		99,74363

Tabela 2 - Comparação da eficiência na remoção do colesterol de diferentes adsorventes

Adsorvente	Colesterol Removido (mg/g adsorvente)	Referências
Alumina/metano	3,0	Mohamed et al. (2000)
Alumina/CO ₂	2,4	Mohamed et al. (1998)
Streamline Phenyl	12,65	Neste trabalho
β-ciclodextrina*	330	Chiu et al. (2004)

*Padrão de colesterol.

3.2. Redução do teor de colesterol do plasma

O teor residual de colesterol no plasma em função do tempo de adsorção, em três valores de diluição é apresentado na Figura 5, em que se verifica a elevação da eficiência na remoção de colesterol com o aumento da diluição do plasma em água. Tal comportamento pode ser atribuído à redução da resistência à transferência de massa com a diminuição da viscosidade do sistema devido ao aumento da diluição do plasma em água. Chiu et al. (2004) relataram comportamento semelhante para a remoção de colesterol com β-ciclodextrina imobilizada em quitosana, nas relações de diluição gema:água de 1:10, 1:20 e 1:30.

Neste trabalho, uma redução no teor de colesterol de 70% foi obtida na maior diluição do plasma (1:4). No entanto, deve-se considerar que valores elevados de diluição podem diminuir o rendimento e levar a perdas econômicas (HSIEH et al., 1994).

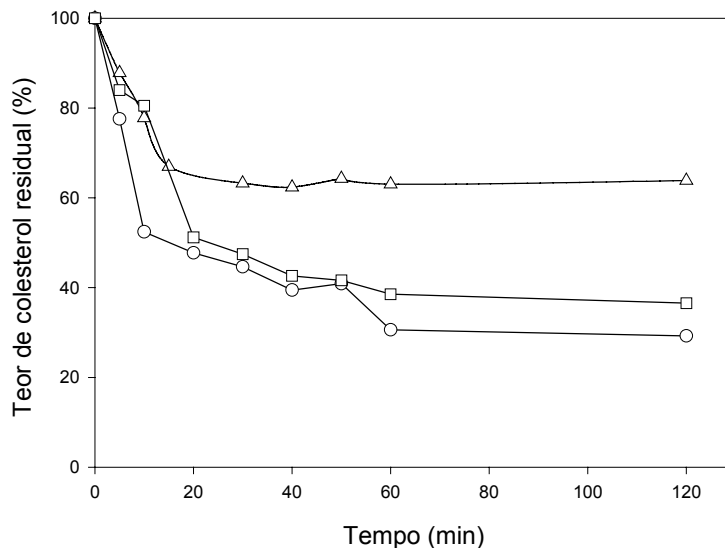


Figura 5 - Redução do teor de colesterol em função do tempo, nas diluições plasma:água de (Δ) 1:0, (□) 1:2 e (○) 1:4.

4. Conclusões

- Os dados de equilíbrio de adsorção hidrofóbica do colesterol em tanques agitados evidenciam uma redução na quantidade de colesterol adsorvida pela resina com a elevação do teor de sal no sistema.

- A isoterma de tipo S ajustou-se melhor aos dados de equilíbrio de adsorção, caracterizados por uma provável competição entre os constituintes do plasma pelos sítos ativos da resina. O modelo proposto adequou-se ao ajuste dos dados de equilíbrio de adsorção do colesterol (RSSE 99,8%).

- A redução no teor de colesterol apresentou uma relação direta com a diluição do plasma em água, obtendo-se uma diminuição do teor de colesterol de 70%, em uma relação de diluição plasma:água de 1:4.

- Assim, a adsorção hidrofóbica apresenta-se como alternativa eficiente para a redução de colesterol na gema de ovo, permitindo trabalhar em meios aquosos sem alterar as características físico-químicas e organolépticas do produto final.

Lista de símbolos

Q = quantidade de colesterol adsorvido por unidade de massa de adsorvente (mg/g)

q_m = quantidade máxima de soluto adsorvida na fase líquida (mg/g).

C_p = concentração de colesterol na fase líquida, no equilíbrio (mg/mL).

K_d = constante de dissociação (mg/mL).

a = parâmetro da equação (2).

b = parâmetro da equação (2).

m = número de pontos experimentais.

p = número de parâmetros ajustados.

δ_{exp} = valores experimentais dos dados de equilíbrio de adsorção.

δ_{cal} = valores calculados dos dados de equilíbrio de adsorção.

SD = desvio padrão (mg/mL).

$RSSE$ = somatório relativo dos quadrados dos erros (%).

5. Referências Bibliográficas

ANTON M.; GANDEMER G. Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of egg yolk. **J. Food Sci.**, v. 62, n. 3, p. 484-487, 1997.

ANTON M.; MARTINET V.; DALGALARRONDO M.; BEAUMAL V.; DAVID-BRIAND E.; RABESONA H. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Food chemistry**, v. 83, p. 175-183, 2003.

BRAGAGNOLO N.; RODRIGUEZ-AMAYA D. B. Avaliação comparativa de três métodos para determinação de colesterol em gema de ovo. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 36, n. 2, p. 237-251, 1993.

BRUNHARA, S. S. **Otimização do processo de extração de colesterol do óleo de manteiga utilizando extrato *Quiluaia saponaria***. Campinas, SP: UNICAMP, 1997, 89 f. Dissertação (Mestrado).

BERLITZ, H. D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. New York: Springer- Verlag, 1987.

BLACKWELDER, J. A.; PIKE, O. A. Oxidative stability of cholesterol-free egg lipid fractions. **J. Food Sci.**, v. 55, n. 1, p. 92-95, 1990.

BURLEY, R. W.; COOK, W. H. Isolation and composition of avian egg yolk granules and their constituents alpha e beta lipovitellins. **Canadian J. Biochemistry Physiol**, v. 39, p.1295-1298, 1961.

CARRILLO, A. R.; KOKINI, J. L. Effect of egg yolk and egg yolk + salt on rheological properties and particle size distribution of model oil-water salad dressing emulsions. **J. Food Sci.**, v. 53, p. 1352-1355, 1988.

CHEN, J.; SUN, Y. Modeling of the effects on hydrophobic adsorption equilibrium of protein **J. Chromatogr. A**. v. 992, p. 29-40, 2003.

CHENFENG, L. V.; TANG, Y.; WANG, L.; WENMING, J. L.; CHEN, Y.; YANG, S.; WANG, W. Bioconversion of yolk cholesterol by extracellular cholesterol oxidase from *Brevibacterium sp.* **Food Chemistry**. v. 77, p. 457-463, 2002.

CHIU, S.-H.; CHUNG, T.-W.; GIRIDHAR, R.; WU, W.-T. Immobilization of β -cyclodextrin in chitosan beads for separation of cholesterol from egg yolk. **Food Research Internacional**. v.37, p. 217-223, 2004.

CHUNG, S. L.; FERRIER, L. K. Partial lipid extraction of egg yolk powder: effects on emulsifying properties and soluble protein fraction. **J. Food Sci.** v. 56, n. 5, p. 1255- 1258, 1991.

CONTE, JR.; JHONSON, B. R.; HSIEH, R.J.; KO, S. S. **Method for removing cholesterol from eggs** U. S. Patent 5,091,203, 1992.

ERIKSSON, K-O. Hydrophobic interaction chromatography. In JANSON J-C, RYDÉN L. (Eds). **Protein purification: principles, high-resolution methods and applications**. Wiley-VCH Inc., 1998 p. 283.

FÄRENMARK, J., GUSTAVSSON, J., LAGERLUND, I.; SANDBERG, L. Characterisation of STREAMLINE™ Phenyl. **Bioseparation**. v. 8, p. 139-144, 1999.

FAUSNAUGH, J. L.; REGNIER, F. E. Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. **J. Chromatogr. A** v. 359, p. 131–146, 1986.

FERREIRA, R. C. **Separação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina de proteínas do soro de queijo por adsorção em colunas de leito fixo**. Vicosa, MG: UFV, 2001 81 f. Dissertação (Mestrado em ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FRONING, G. W.; WEHLING, R. L.; CUPPETT, S. L.; PIERCE, M. M.; NIEMANN, L.; SIEKMANK, D. K. Extraction of cholesterol and other lipids from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide. **J. Food Sci.** v. 55, n. 1, p. 95-98, 1990.

GILES, C. H., MACEWAN, T. H., NAKHMA, S. N.; SMITH, D. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. *J. Chem Soc.* 1960, 3973-3993.

HSIEH, R. J.; SNYDER, D. P; FORD, E.W. **Method for removing cholesterol and fat from egg yolk by chelation and reduced-cholesterol egg product**. U.S.Patent. 5,302,405, 1994.

JOHNSON, C. B. Isolation of Cholesterol Oxidation Products from Animal Fat Using Aminopropyl Solid-Phase Extraction, **J. Chromatogr. A**. v. 736, p. 205-210. 1996.

KIM, K., KIM, C.; BYUN, Y. Preparation of a dipalmitoyl-phosphatidylcholine/cholesterol Langmuir-blodgett monolayer that suppresses protein adsorption. **Langmuir**, v. 17, p. 5066-5070, 2001.

KIOSSEOGLOU, V. D. Egg yolk. In CHARALAMBOUS, G.; DOXASTAKIS, G. (Eds.). **Developments in food science**. Food emulsifiers. Chemistry, technology, functional properties and applications. Amsterdam: Elsevier, 1989, p. 63.

KWAN L. E.; LICHAN, N.; HELBI G.; NAKAI, S. Fractionation of water-soluble and Insoluble Components from egg yolk with minimum use of organic solvents. **J. Food Sci.** v. 56, n. 6, p. 1537-1541, 1991.

LEVISON, P. R.; HOPKINS, A. K.; HATHI, P.; BADGER, S. E.; MANN, F.; DICKSOO, N.; PURDOM, G. Suspended bed chromatography, a new approach in downstream processing. **J. Chromatogr. A** v. 890, p. 45–51, 2000.

LYDDIAT, A. Process chromatography: current constraints and future options for the adsorptive recovery of bioproducts. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 95-103, 2002.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica agroindustrial**. Zaragoza (España) Editorial Acribia, S.A, 1996.

MCBEE, L. E.; COTTERILL, O. J. Ion exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk lipoproteins. **J. Food Sci.** v. 44, p. 656-660, 1979.

MARTUCCI, E. T.; BORGES S. V. Extraction of cholesterol from dehydrated egg yolk with acetone: determination of the practical phase equilibrium and simulation of the extraction process. **J. Food Engineering**. v. 32, p. 365-373, 1997.

MELANDER, W.; CORRADINI, D.; HORVATH, C. Salt mediated retention of proteins in hydrophobic interaction chromatography. Application of solvophobic theory. **J. Chromatogr. A**, v. 317, p. 67–85, 1984.

MISSLER, S. R.; WASILCHUCK, B. A; MERRITT, JR. Separation and Identification of Cholesterol Oxidation Products in Dried Egg Preparations, **J. Food Sci.** v. 50, p. 595-598, 1985.

MOHAMED, R. S.; NEVES, G. B. M.; KIECKBUSCH, T.G. Reduction in cholesterol and fractionation of butter oil using supercritical CO₂ with adsorption on alumina. **International J. Food Sci. and Technology**, v. 33, p. 445-454, 1998.

MOHAMED, R. S.; SALDANA, M. D. A.; SOCANTAYPE, F. H.; KIECKBUSCH, T.G. Reduction in the cholesterol content of butter oil using supercritical ethane extraction and adsorption on alumina. **International J. Food Sci. and Technology**, v. 33, p. 445-454, 2000.

OGASAHARA, J.; HARIU, H.; TAKAHASHI, M. **Process for producing liquid having cholesterol content**. U. S. Patent 5,116,628. 1992.

PALIT, D.; MOULIK, S. P. Adsorption behaviors of L-histidine and DL-tryptophan on cholesterol, silica, alumina and graphite. **J. Colloid and Interface Sci.** v. 239, p. 20-26, 2001.

PEREIRA, M. J. A. **Adsorção de beta-galactosidase de *Scopulariopsis sp.* em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a ampliação de escala**. Campinas, SP: UNICAMP, 1999. 138 f. Dissertação (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RAZZAZI-FAZELI, E.; KLEINEISEN, S.; LUF., W. Determination of cholesterol oxides in processed food using high performance liquid chromatography - mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionisation, **J. Chromatogr. A.** v. 896, p. 321-334. 2000.

SHUKLA, T. P. Industrial research on cyclodextrins. **Cereal Foods World.**, v. 36, p. 347-356, 1991.

SMITH, D. M.; AWAD, A. C.; BENNINK, M. R.; GILL, J. L. Cholesterol reduction in liquid egg yolk using β -Ciclodextrin. **J. Food Sci.**, v. 60, n. 4, p. 691-694, 1995.

STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. **Egg Science and Technology**. 3^{ed}. Wesport: AVI Publischer Company, 1995. 449 p.

SUNDFELD, E.; YUN, S.; KROCHTA, J. M.; RICHARDSON, T. Separation of cholesterol from Butteroil using Quillaja Saponins: 1. Effects of pH, contact time and adsorbent. **J. Food Process Engineering**, v. 16, p. 191-205, 1993.

TONG, X.-D.; XUE, B.; SUN, Y. Modeling of expanded-bed protein adsorption by taking into account the axial particle size distribution **Biochemical Engineering J.** v. 16, p. 265-272, 2003.

VOLLBRECHT, H. R.; CULLY J.; WIESMULLER, J. **Process for the removal of cholesterol esters from egg yolk.** U. S. Patent 5,063,077, 1991.

WATANABE, A.; SHIMIZU, K.; AIHARA, H.; NAKAMURA, H.; SUZUKI, R.; KOMAGATA, K. Isolation and identificador of cholesterol-degrating Rhodococcus strains from food of animal origim and their cholesterol oxidadse activites. **J. General Applied Microbiology.** v. 32, p. 137-147, 1986.

WRIGHT, P. R.; GLASSER, B. J. Modeling mass transfer and hydrodynamics in fluidized-Bed Adsorption of proteins. **AIChE Journal** 47, 2, (2001) 474-488.

YOSHINORI, M.; BERGOUGNOUX, M. Adsorption properties of cholesterol reduced egg yolk low-density liprotein at oil-in- water interfaces. **J. Agric. Food Chem.** v. 46, p. 2152-2158, 1998.

ZHANG R.-Z.; LI L.; LIU S.-T.; CHEN R.-M.; RAO P.-F. An improved method of cholesterol determination in egg yolk by HPLC. **Journal Food Biochemistry.** v. 23, p. 351-361, 1999.

ZHANG S.; SUN, Y. Steric mass-action model for dye-ligand affinity adsorption of protein **J. Chromatogr. A.** v. 957, p. 89-97, 2002.

CAPÍTULO 4

ADSORÇÃO DAS PROTEÍNAS DA CLARA DE OVO EMPREGANDO CROMATOGRAFIA POR INTERAÇÃO HIDROFÓBICA

Adsorção das proteínas da clara de ovo empregando cromatografia por interação hidrofóbica

Resumo

Dados de equilíbrio de adsorção hidrofóbica das proteínas da clara do ovo lisozima, conalbumina e ovalbumina foram obtidos em tanques agitados a 25 ± 2 °C. A resina de interação hidrofóbica usada foi a Streamline Phenyl[®]. Foi avaliada a influência do tipo de sal (NaCl, Na₂SO₄ e (NH₄)₂SO₄) e da sua concentração sobre os dados de equilíbrio. Observou-se o aumento da retenção das proteínas com a elevação da concentração de sal nos sistemas. O sal Na₂SO₄ apresentou maior interação com as proteínas estudadas favorecendo, assim, a adsorção das proteínas pelo adsorvente, embora cada tipo de sal tenha interagido de forma diferenciada com cada uma das proteínas. Os três modelos de isotermas empregados (Langmuir, Langmuir exponencial e CHEN e SUN) ajustaram-se bem aos dados de equilíbrio, não se encontrando diferença significativa entre eles no nível de 5%. O modelo de transferência de massa empregado simulou corretamente o comportamento da cinética de adsorção das proteínas nas condições estudadas.

1. Introdução

A clara é uma fonte natural de proteínas de reconhecido potencial nutricional, biológico e de interesse tecnológico (AWADE et al., 1994; CROGUENNEC et al., 2000). Três proteínas de particular importância presentes na clara são a conalbumina, lisozima e ovalbumina. A conalbumina (13% do total de proteínas da clara) é uma glicoproteína com atuação no transporte do ferro e de ampla atividade antimicrobiana. A lisozima (3,5% do total de proteínas da clara) tem propriedades antibactericidas e é usada amplamente na preservação de alimentos e na indústria farmacêutica. A ovalbumina (54% do total de proteínas da clara) é uma glicoproteína com propriedades de coagulação e geleificação (VACCHIER et al., 1995). A importância dessas proteínas tem estimulado o aparecimento de novas tecnologias para sua separação e purificação, em substituição às técnicas tradicionais, como precipitação com sais ou extração com solventes, as quais apresentam desvantagens associadas a desnaturação e baixa pureza das proteínas.

Diante das dificuldades encontradas com os processos existentes, uma técnica com potencial de adequação à purificação de proteínas da clara é a adsorção, na qual certos componentes de uma fase fluida são transferidos para a superfície de um adsorvente sólido, em um fenômeno de superfície. A adsorção por troca iônica foi aplicada, em escala de laboratório, para purificação das proteínas da clara de ovo por AWADE et al. (1994), CROGUENNEC et al. (2000), LEVISON et al. (1992) e VACCHIER et al. (1995).

O poder de fracionamento dos processos cromatográficos por adsorção (tanques agitados, leito fixo e leito fluidizado) transforma-os em uma técnica atrativa de separação molecular, macromolecular e de eliminação de substâncias contaminantes dos bioprodutos a purificar (LYDDIATT, 2002). A cromatografia de adsorção em tanques agitados, ou batelada, é um processo simples, usado na avaliação do equilíbrio de adsorção e desorção, na cinética de adsorção das proteínas (CHANG e CHASE, 1996; ZHANG e SUN, 2002; TONG e SUN, 2003, CHEN et al., 2003), na determinação de parâmetros de modelos (como parâmetros de equilíbrio de adsorção e difusividade intrapartícula), empregados na simulação de processos cromatográficos em grande escala, como de leito expandido e leito móvel simulado (LI et al, 2003).

A escolha da técnica cromatográfica para efetuar dada separação dependerá de certas propriedades biológicas e físico-químicas dos compostos de interesse, como carga líquida (cromatografia de troca iônica), características bioespecíficas (cromatografia por bioafinidade) e hidrofóbicas (cromatografia por interação hidrofóbica), entre outras.

A cromatografia por interação hidrofóbica (CIH) tem por fundamento as interações hidrofóbicas dos ligantes imobilizados na fase estacionária com as regiões não-polares das proteínas (QUEIROZ et al., 2001). A retenção das proteínas pode ser elevada com o aumento do teor de sal na fase móvel, e a eluição é alcançada pela redução da concentração de sal no eluente (MELANDER et al., 1984; FAUSNAUGH e REGNIER, 1986). Como a cromatografia de fase reversa (CFR), a CIH, além de usar as características hidrofóbicas das proteínas, apresenta a vantagem de trabalhar em ambientes mais polares e menos desnaturantes nas proteínas. Adicionalmente, não necessita de solventes apolares, como na CFR, para a eluição das proteínas, devido à fraca ligação das biomoléculas com o adsorvente (EL RASSI, 1996).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a adsorção em tanques agitados das proteínas da clara, lisozima, conalbumina e ovalbumina, empregando uma resina de característica hidrofóbica, em diferentes concentrações e tipos de sais, à temperatura ambiente. A análise da retenção das proteínas foi conduzida com base nos dados de equilíbrio da adsorção e da cinética de adsorção do processo. Tais informações levam a uma melhor compreensão do processo de separação e permitem a otimização da eficiência da separação.

2. Material e métodos

2.1. Material

A ovalbumina, lisozima e conalbumina foram adquiridas da Sigma (USA). A resina empregada nos experimentos foi a Streamline Phenyl[®] (Amershan Pharmacia Biotech, Sweden), com densidade e tamanho de partícula de 1,2 g/mL e 100 a 300 µm, respectivamente. Nos experimentos foram empregados água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore Inc., USA) e reagentes químicos de graus analítico e cromatográfico.

2.2. Quantificação das proteínas

As proteínas foram analisadas por espectrofotometria a 280 nm (CHANG, 1998). A proteína solubilizada no tampão fosfato, com diferentes concentrações e tipos de sais, foi quantificada, a 280 nm, por espectrofotometria (Cary 50, Varian, Austrália), usando a curva analítica correspondente.

2.3. Experimentos de adsorção

Na determinação dos dados de equilíbrio da adsorção de cada uma das proteínas da clara conalbumina, lisozima e ovalbumina foi seguida a metodologia de adsorção em tanques agitados, descrita na literatura (TONG et al., 2003; CHEN e SUN, 2003).

Assim, a partir da adição de 0,2 g do adsorvente (resina Streamline Phenyl[®]) a 10 mL de uma solução aquosa de tampão fosfato (20 mM e pH 7,0) contendo o sal avaliado (NaCl, Na₂SO₄ e (NH₄)₂SO₄) em concentrações de sal pré-definidas. As concentrações de NaCl estudadas foram de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 M, e as concentrações de Na₂SO₄ e (NH₄)₂SO₄ de 0,0; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 M. Após 8 h, a solução tampão foi separada da resina e esta resina

equilibrada foi adicionado 10 mL de solução protéica contendo o sal avaliado nas concentrações pré-definidas (CHEN e SUN, 2003; ZHANG e SUN, 2002). A faixa de concentração da proteína na solução variou entre (0 e 4) mg/mL. A mistura foi agitada por 8 h, a 25 ± 2 °C, utilizando-se o dispositivo para simular um tanque agitado proposto por FERREIRA (2001) e PEREIRA (1999). A resina foi, a seguir, separada e o teor de proteína do sobrenadante, quantificado por espectofotometria a 280 nm. A quantidade de massa de proteína retida na resina foi calculada por balanço de massa.

2.4. Modelagem dos dados de equilíbrio

Três modelos matemáticos descritos na literatura, com base em conceitos do equilíbrio termodinâmico, foram usados para ajustar e descrever os dados de equilíbrio:

- Modelo da isoterma de Langmuir:

$$Q = \frac{q_m \cdot C_p}{k_d + C_p} \quad (1)$$

sendo Q , a quantidade de proteína adsorvida por unidade de massa de adsorvente (mg/g); C_p , a concentração de proteína na fase líquida, no equilíbrio (mg/mL); q_m , a quantidade máxima de soluto adsorvida na fase líquida (mg/mL resina); e k_d , a constante de dissociação que descreve o equilíbrio de adsorção (mg/mL).

- Modelo de Langmuir exponencial modificado (ANTIA e HORVATH, 1989)

$$Q = \frac{\lambda b \exp(-kC_s)C_p}{1 + b \exp(-kC_s)C_p} \quad (2)$$

em que C_s é a concentração de sal na fase líquida e λ , b e k são parâmetros da equação.

- Modelo proposto por CHEN e SUN (2003):

$$\frac{Q}{C_p} = K_{ps} C_s^\alpha [\Lambda - (n + \sigma)Q]^n \quad (3)$$

sendo Λ a densidade do ligante hidrofóbico e K_{ps} , n , α e σ parâmetros da equação.

2.5. Cinética de adsorção

Os experimentos para determinação da cinética de adsorção foram conduzidos a partir da adição de 0,5 g de adsorvente, previamente equilibrado no tampão fosfato (20 mM e pH 7) e contendo o sal na concentração pré-selecionada, a 50 mL da solução protéica em

concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL. A mistura foi, então, agitada por 8 h (FERREIRA, 2001; PEREIRA, 1999) a 25 ± 2 °C. Em intervalos de tempo de 5 min foram tomadas amostras de 2 mL, cuja concentração protéica foi imediatamente determinada. A amostra foi, então, devolvida à solução (TONG et al., 2003). Assim, foi quantificada a redução do conteúdo protéico na fase líquida do sistema, em função do tempo. As concentrações de sal usadas para cada proteína foram de 1 M de Na_2SO_4 para a lisozima, 0,8 M de Na_2SO_4 para a conalbumina e 0,8 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para a ovalbumina.

2.6. Modelo de transferência de massa

O modelo de transferência de massa em tanques agitados empregado envolve o balanço de massa sobre a partícula e o balanço de massa na fase líquida externa à partícula (CARRERE, 1993; HORSTMANN e CHASE, 1989). As considerações básicas utilizadas para a formulação do modelo foram de que:

- (1) O processo de adsorção é isotérmico.
- (2) Os adsorventes porosos são esféricos e de tamanho uniforme.
- (3) Existe equilíbrio local para cada componente presente no ligante e no líquido estagnado dentro dos poros, podendo ser representado pela equação de Langmuir:

$$C_{pi}^s = \frac{q_m \cdot c}{k_d + c} \quad (4)$$

- (4) Os coeficientes de difusão e transferência de massa são constantes e independentes dos efeitos de mistura dos componentes.

A partir dessas considerações foram obtidas as Equações (5) e (6), respectivamente, para cada componente, nas fases extrapartícula e intrapartícula.

$$\frac{\partial C_{bi}}{\partial t} + \frac{3V_p k_i}{R_p V_b} (C_{bi} - C_{pi, R=R_p}) = 0 \quad (5)$$

$$(1 - \varepsilon_p) \frac{\partial C_{pi}^s}{\partial t} + \varepsilon_p \frac{\partial C_{pi}}{\partial t} - \varepsilon_p D_{pi} \left[\frac{1}{R^2} \frac{\partial}{\partial R} \left(R^2 \frac{\partial C_{pi}}{\partial R} \right) \right] = 0 \quad (6)$$

Com as seguintes condições iniciais e de contorno:

$$t = 0 \Rightarrow C_{bi} = C_{0i} \quad (7)$$

$$t = 0 \Rightarrow C_{pi} = 0 \quad (8)$$

$$R = 0 \Rightarrow \frac{\partial C_{pi}}{\partial R} = 0 \quad (9)$$

$$R = R_p \Rightarrow \frac{\partial C_{pi}}{\partial R} = \frac{k_i}{\varepsilon_p D_{pi}} (C_{bi} - C_{pi, R=R_p}) \quad (10)$$

O modelo matemático de transferência de massa para tanques agitados, dado pelas Equações (5) e (6), com as condições iniciais e de contorno, Equações (7), (8), (9) e (10), foi reduzido a um sistema de equações algébricas, usando-se o método implícito de diferenças finitas com o passo à frente. Esse sistema de equações diferenciais e algébricas foi resolvido simultaneamente pelo método de Gauss-Seidel (SARAIVA, 2003).

Os valores dos parâmetros do coeficiente de difusão (D_p) e transferência de massa (k) para cada proteína foram determinados: *i*) por correlação (D_p) e regressão não-linear (k), (CRNL); e *ii*) ambos por regressão não-linear (RNL). Na regressão não-linear foi empregado o método de programação quadrática sucessiva, sendo o cálculo de D_p efetivado pela correlação proposta por POLSON (1950), que relacionou diretamente D_p (m^2/s) com a massa molar de cada proteína:

$$D_p = 2,74 * 10^{-9} (Mm)^{-1/3} \quad (11)$$

3. Resultados e discussão

3.1. Equilíbrio de adsorção

As isotermas de adsorção para a conalbumina, lisozima e ovalbumina em diferentes tipos de sais e concentrações são apresentadas nas Figuras 1 a 9. Em todos os casos, observou-se o aumento da retenção da proteína com a elevação da concentração do sal no sistema. Comportamento semelhante foi verificado por CHEN e SUN (2003), ao avaliarem a influência da concentração do sal no equilíbrio da adsorção hidrofóbica da albumina de soro bovino (BSA). Tal comportamento pode ser devido, à elevação da tensão interfacial (interface água-proteína) com o aumento do teor de sal na solução. Maior quantidade de sal levará à redução do número de moléculas de água em torno da proteína, e, assim, a uma

maior exposição das regiões hidrofóbicas da proteína com uma conseqüente diminuição da solubilidade protéica (WONG, 1995; ERIKSSON, 1998; GRUND, 1998). Esse fenômeno é a base da teoria solvofóbica ou teoria da cavidade, proposta por Sinanoglu e Abdalnur em 1965 (MELANDER e HORVANTH, 1977). Posto que o conteúdo salino deve ser inferior ao valor da concentração de saturação que conduz à precipitação das proteínas, a maioria das operações com CIH, para a separação de proteínas com elevada densidade de grupos hidrofóbicos, é processada em baixas concentrações de sal (ERICKSON, 1998). No presente trabalho, concentrações de Na_2SO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ acima de 1,0 M levaram à desnaturação da conalbumina e ovalbumina, dificultando a quantificação e inviabilizando o processo.

O tipo de sal usado na retenção hidrofóbica é um parâmetro importante na otimização do processo de separação de proteínas por CIH (PHARMACIA, 1993; MAHN et al., 2004). Na Tabela 1, observa-se a seletividade de cada proteína para cada tipo de sal. O sal Na_2SO_4 apresentou maior interação com as três proteínas estudadas, favorecendo, assim, a adsorção da proteína pelo adsorvente. No entanto, a ordem de interação preferencial para cada tipo de sal depende de cada proteína; na lisozima e conalbumina, a ordem é $\text{Na}_2\text{SO}_4 > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{NaCl}$ e na ovalbumina, $\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{NaCl} > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Resultados semelhantes em outras proteínas foram relatados na literatura (HORVATH et al., 1976; GENG et al., 1990; CHEN e SUN, 2003). Arakawa (1986) estudando a interação sal-proteína relatou, também, que outros sais como o MgCl_2 , que, apesar de aumentar a tensão interfacial no sistema como os outros sais (sulfato de sódio, fosfatos, etc.), promovem a solubilidade das proteínas e não aumentam as interações hidrofóbicas da proteína com a fase estacionária hidrofóbica, como seria esperado, devido à elevação da tensão interfacial.

Os fatores responsáveis pela interação preferencial das proteínas com cada tipo de sal são o incremento da tensão interfacial, o pH e a área hidrofóbica da superfície das proteínas (ARAKAWA e TIMASHEFF, 1984). No presente trabalho, o comportamento diferenciado deve-se, provavelmente, à significativa diferença de hidrofobicidade da lisozima em relação à conalbumina e ovalbumina (Tabela 1) e à diferença no incremento da tensão interfacial dos sais (1,64; 2,16; e 2,73 $\text{din}\cdot\text{g}/\text{cm}\cdot\text{mol}$) para o NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e Na_2SO_4 , respectivamente.

Assim, a interação preferencial sal-proteína apresenta-se como um parâmetro importante no conhecimento da eficiência do sal para manter ou não a estabilidade da estrutura protéica, além de avaliar o comportamento do sal como um agente promotor do “salting-in” ou “salting-out” (ARAKAWA e TIMASHEFF, 1982).

Tabela 1 - Efeito do tipo de sal sobre a adsorção hidrofóbica das proteínas da clara

Proteína	Hidrofobicidade (cal/res)*	q_m (mg/mL de resina)		
		NaCl (1 M)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 M)	Na_2SO_4 (1 M)
Conalbumina	1.080	47,732	38,646	97,7984
Lisozima	970	19,718	47,760	70,7184
Ovalbumina	1.110	121,602	78,495	165,996

*Fennema (1993).

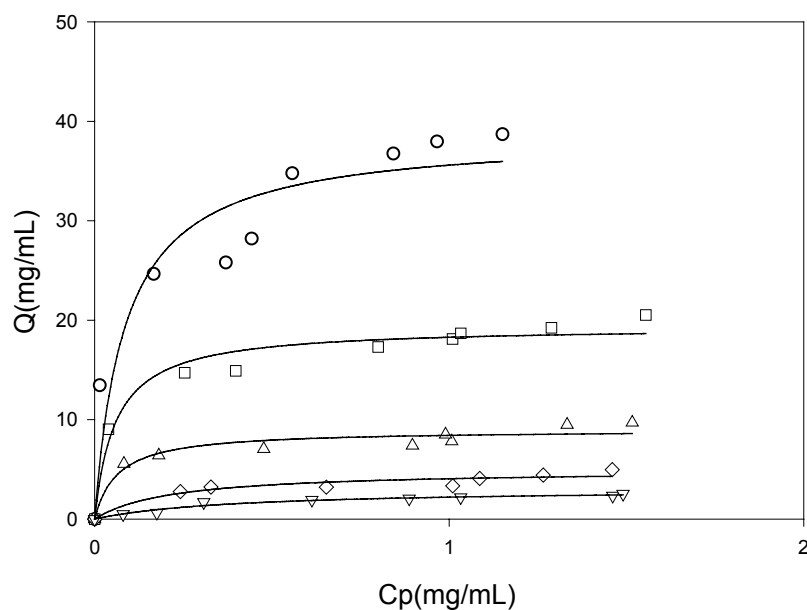


Figura 1 - Isotermas de adsorção da conalbumina em diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: (o) 1,0 M; (\square) 0,8 M; (Δ) 0,5 M; (\diamond) 0,3 M e (∇) 0,0 M.

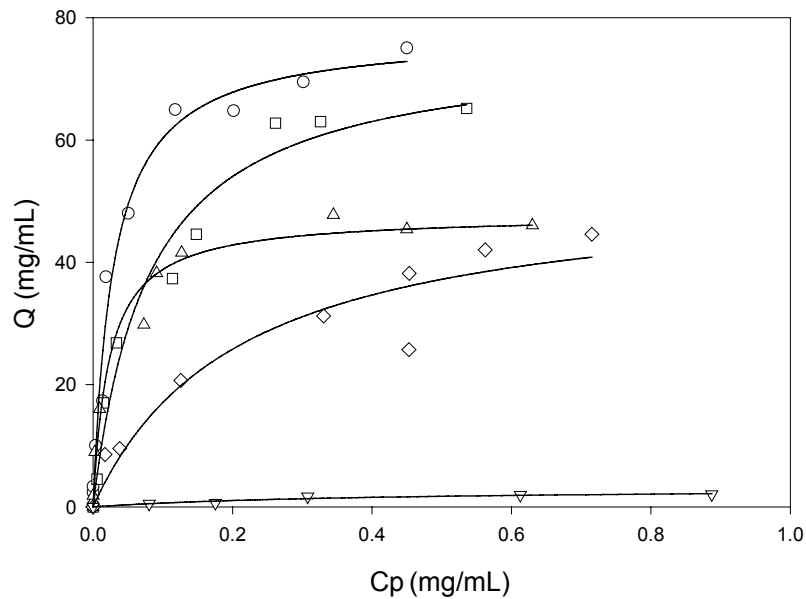


Figura 2 - Isotermas de adsorção da conalbumina em diferentes concentrações de NaCl: (o) 2,0 M; (□) 1,5 M; (Δ) 1,0 M; (◇) 0,5 M e (▽) 0,0 M.

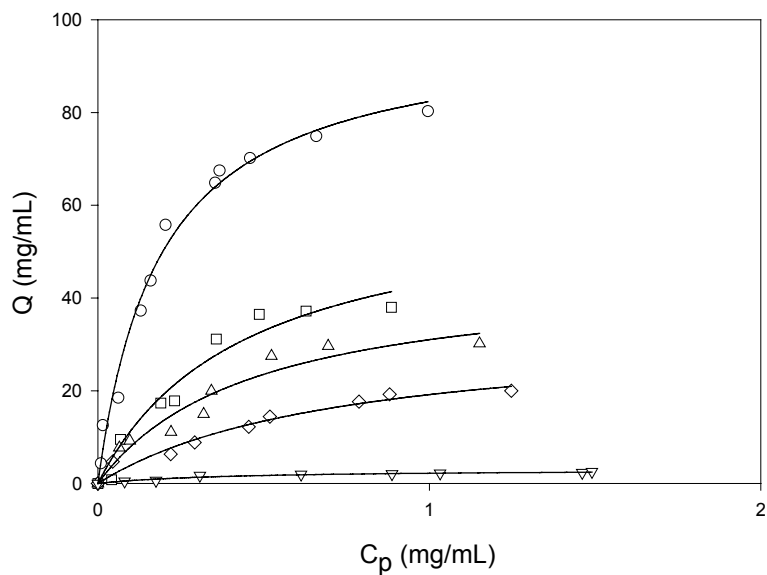


Figura 3 - Isotermas de adsorção da conalbumina em diferentes concentrações de Na₂SO₄: (o) 1,0 M; (□) 0,8 M; (Δ) 0,5 M; (◇) 0,3 M e (○) 0,0 M.

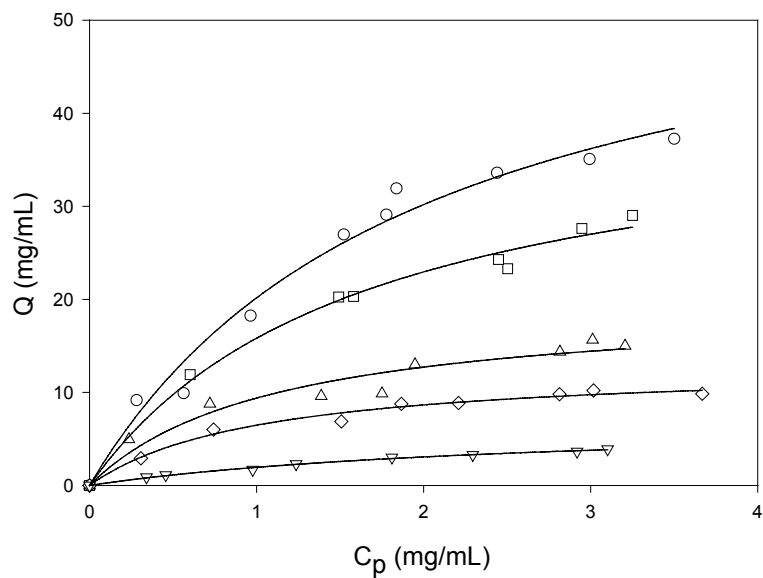


Figura 4 - Isotermas de adsorção da lisozima em diferentes concentrações de NaCl: (o) 2,0 M; (□) 1,5 M; (Δ) 1,0 M; (◇) 0,5 M e (▽) 0,0 M.

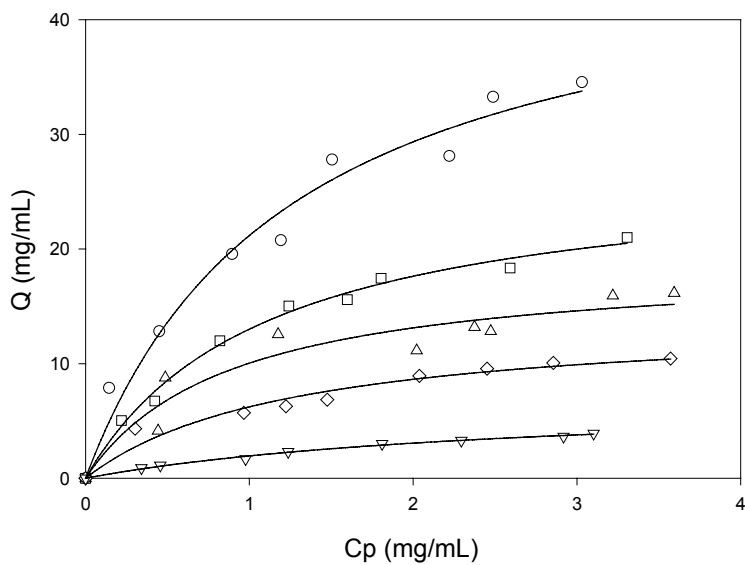


Figura 5 - Isotermas de adsorção da lisozima em diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: (o) 1,0 M; (□) 0,8 M; (Δ) 0,5 M; (◇) 0,3 M e (▽) 0,0 M.

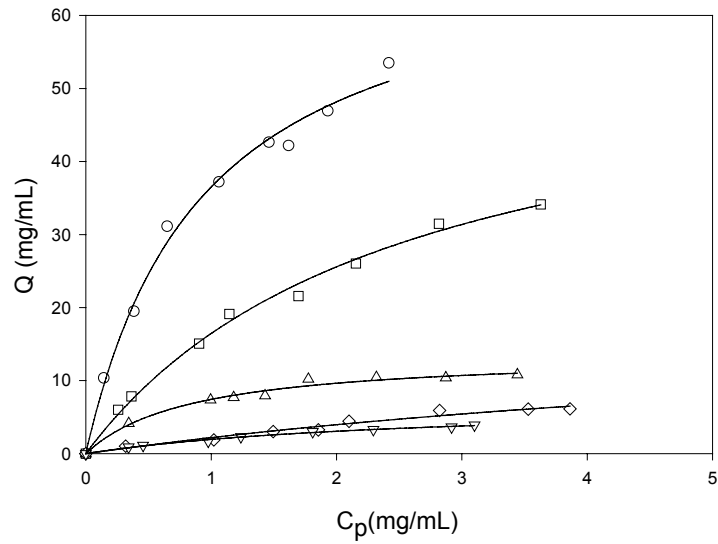


Figura 6 - Isotermas de adsorção da lisozima em diferentes concentrações de Na_2SO_4 : (o) 1,0 M; (\square) 0,8 M; (Δ) 0,5 M; (\diamond) 0,3 M e (∇) 0,0 M.

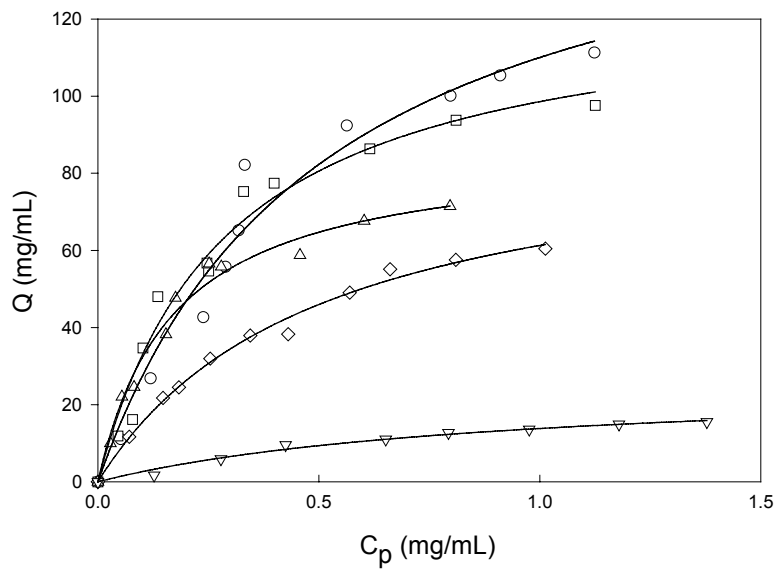


Figura 7 - Isotermas de adsorção da ovalbumina em diferentes concentrações de Na_2SO_4 : (o) 1,0 M; (\square) 0,8 M; (Δ) 0,5 M; (\diamond) 0,3 M e (∇) 0,0 M.

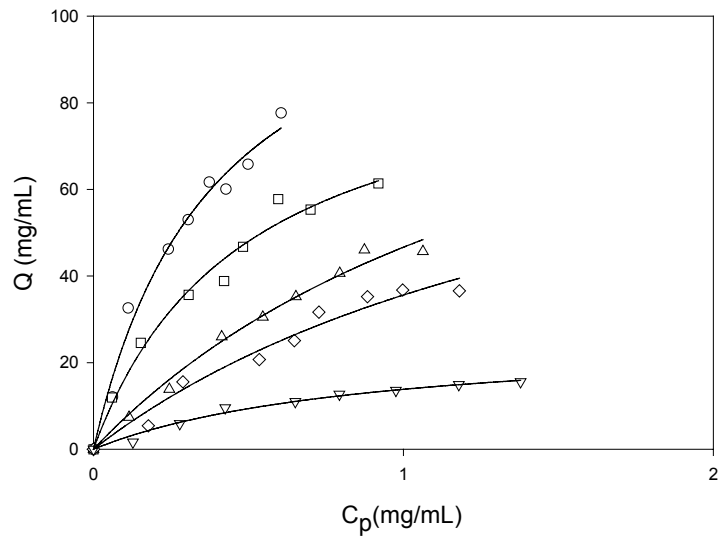


Figura 8 - Isotermas de adsorção da ovalbumina em diferentes concentrações de NaCl: (o) 2,0 M; (□) 1,5 M; (Δ) 1,0 M; (◇) 0,5 M e (▽) 0,0 M.

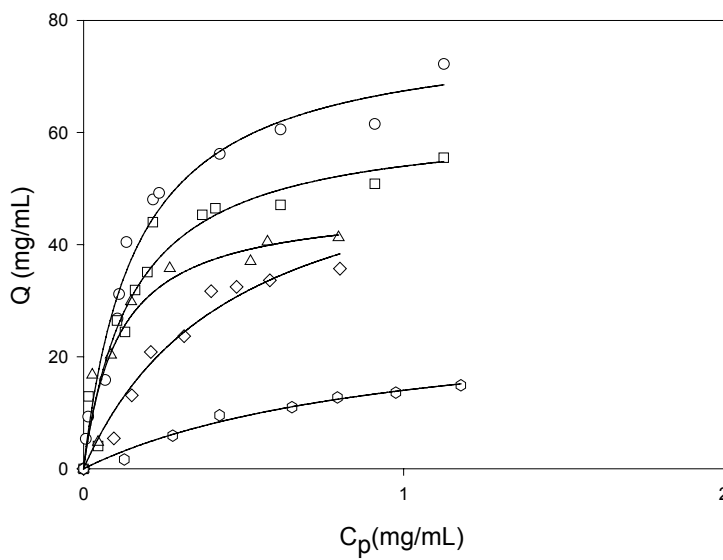


Figura 9 - Isotermas de adsorção da ovalbumina em diferentes concentrações de (NH₄)₂SO₄: (o) 1,0 M; (□) 0,8 M; (Δ) 0,5 M; (◇) 0,3 M e (▽) 0,0 M.

3.2. Modelagem dos dados de equilíbrio de adsorção

Os dados de equilíbrio de adsorção das proteínas foram ajustados pelos três modelos de isotermas (Eqs. (1), (2) e (3)). Nas Tabelas 2 a 4 são apresentados os resultados da análise estatística, com base nos valores do desvio padrão (*SD*) e do somatório relativo dos quadrados dos erros (*RSSE*) calculados pelas Eqs (12) e (13), respectivamente. O *RSSE* avalia a qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais (TONG et al., 2003).

$$SD = \left[\frac{\sum_{i=1}^m (\delta_{\text{exp},i} - \delta_{\text{cal},i})^2}{(m - p)} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (12)$$

$$RSSE = \left[\sum_{i=1}^m \left(\frac{(\delta_{\text{exp},i})^2 - (\delta_{\text{exp},i} - \delta_{\text{cal},i})^2}{\delta_{\text{exp},i}^2} \right) \right] \times \frac{100\%}{m} \quad (13)$$

em que $\delta_{\text{exp},i}$ e $\delta_{\text{cal},i}$ são os valores experimentais e os calculados dos dados de equilíbrio de adsorção, respectivamente; m , o número de pontos experimentais; e p , o número de parâmetros ajustados.

Assim, pode-se observar, nas Tabela 2 e 3, que a Equação (1) foi a que melhor se ajustou (maior *RSSE*) aos dados experimentais das proteínas conalbumina e lisozima. Na Tabela 4, verifica-se que a Equação (2) foi a que apresentou a maior média de *RSSE* para a ovalbumina. No entanto, a diferença entre as médias de *RSSE*, nos três modelos estudados, não foi significativa no nível de 5%, pelo teste de Student (t), nas três proteínas. Comportamento semelhante foi descrito por CHEN e SUN (2003), ao ajustarem os dados de equilíbrio de adsorção do BSA pelas Equações (1) e (3).

3.3. Cinética de adsorção

Os dados da cinética de adsorção da conalbumina, lisozima e ovalbumina em concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL, são apresentados nas Figuras 10 a 12, respectivamente. Observa-se, nessas figuras, a influência da concentração da proteína sobre a cinética de adsorção, pela queda na retenção com o aumento do conteúdo protéico no meio. O mesmo comportamento foi descrito por CHANG e CHASE (1996) para a lisozima e por TONG et al. (2003) em BSA, usando as resinas Streamline DEAE e Streamline SP, respectivamente.

Tabela 2 - Ajuste dos dados de equilíbrio de adsorção da conalbumina

	Modelos de Isotermas					
	Equação (1)		Equação (2)		Equação (3)	
	<i>SD</i> (mg/mL)	<i>RSSE</i> (%)	<i>SD</i> (mg/mL)	<i>RSSE</i> (%)	<i>SD</i> (mg/mL)	<i>RSSE</i> (%)
NaCl (M)						
0,5	0,051	96,250	0,055	96,250	0,072	92,357
1,0	0,059	97,772	0,043	74,728	0,091	63,895
1,5	0,041	96,095	0,064	97,768	0,109	88,552
2,0	0,054	96,744	0,058	77,395	0,073	77,395
Na ₂ SO ₄ (M)						
0,3	0,017	94,838	0,019	94,838	0,019	94,140
0,5	0,036	96,424	0,039	96,424	0,036	95,164
0,8	0,043	98,684	0,046	98,684	0,030	98,061
1,0	0,044	96,270	0,048	96,270	0,049	94,939
(NH ₄) ₂ SO ₄ (M)						
0,3	0,006	98,552	0,006	98,552	0,012	95,372
0,5	0,010	99,121	0,011	99,121	0,033	89,832
0,8	0,016	99,316	0,018	99,312	0,056	90,579
1,0	0,056	94,784	0,060	94,988	0,095	87,793

Tabela 3 - Ajuste dos dados de equilíbrio de adsorção da lisozima

	Modelos de Isotermas					
	Equação (1)		Equação (2)		Equação (3)	
	<i>SD</i> (mg/mL)	<i>RSSE</i> (%)	<i>SD</i> (mg/mL)	<i>RSSE</i> (%)	<i>SD</i> (mg/mL)	<i>RSSE</i> (%)
NaCl (M)						
0,5	0,039	99,608	0,035	99,608	0,056	98,460
1,0	0,107	97,754	0,097	97,743	0,142	94,322
1,5	0,093	99,797	0,083	99,797	0,136	99,278
2,0	0,154	98,104	0,143	98,104	0,127	98,343
Na ₂ SO ₄ (M)						
0,3	0,029	98,048	0,031	98,048	0,027	97,830
0,5	0,034	99,732	0,037	99,731	0,053	98,693
0,8	0,064	99,680	0,069	99,680	0,107	98,800
1,0	0,120	99,711	0,130	99,711	0,275	98,027
(NH ₄) ₂ SO ₄ (M)						
0,3	0,052	97,921	0,056	97,924	0,075	96,300
0,5	0,117	94,982	0,127	94,981	0,183	95,919
0,8	0,044	99,599	0,048	99,599	0,112	97,926
1,0	0,137	97,840	0,148	97,839	0,214	95,474

Tabela 4 - Ajuste dos dados de equilíbrio de adsorção da ovalbumina

	Modelos de Isotermas					
	Equação (1)		Equação (2)		Equação (3)	
	<i>SD</i> (mg/mL)	<i>RSSE</i> (%)	<i>SD</i> (mg/mL)	<i>RSSE</i> (%)	<i>SD</i> (mg/mL)	<i>RSSE</i> (%)
NaCl (M)						
0,5	0,055	94,118	0,060	94,115	0,046	96,986
1,0	0,040	99,427	0,044	99,421	0,029	99,817
1,5	0,066	99,352	0,071	99,351	0,089	98,122
2,0	0,076	97,811	0,082	97,811	0,114	98,674
Na ₂ SO ₄ (M)						
0,3	0,016	88,136	0,195	97,642	0,126	98,946
0,5	0,077	98,926	0,200	96,073	0,059	99,209
0,8	0,039	99,816	0,133	93,222	0,156	97,549
1,0	0,127	93,221	0,168	97,090	0,167	98,925
(NH ₄) ₂ SO ₄ (M)						
0,3	0,060	89,421	0,065	89,453	0,053	93,601
0,5	0,101	84,949	0,109	97,085	0,156	81,901
0,8	0,102	96,634	0,107	88,581	0,170	87,180
1,0	0,084	95,962	0,088	95,962	0,188	91,298

A redução na retenção das proteínas deveu-se, provavelmente, à elevação da viscosidade da solução. GUNDÜZ (2004) relatou o aumento da viscosidade de uma solução aquosa de BSA com a elevação da concentração da proteína. Maior viscosidade pode provocar a aglomeração das moléculas protéicas nos poros das partículas do adsorvente, dificultando difusão da proteína. Como observado na Tabela 5, os valores dos parâmetros k e D_p empregados no modelo de transferência de massa não foram influenciados pela concentração da proteína, o que também está de acordo com o comportamento adsorptivo da BSA em resina Streamline DEAE (TONG et al., 2003).

Considerando que o modelo empregado na simulação da cinética de adsorção protéica é dependente dos parâmetros de transferência de massa D_p e k , a técnica de obtenção dos parâmetros é decisiva no ajuste dos dados cinéticos. Pode-se inferir das Figura 10 a 12 que valores dos parâmetros obtidos por correlação e regressão não linear (CRNL) foram os que levaram a um melhor ajuste dos dados da cinética das três proteínas estudadas

Os valores do D_p , obtidos por correlação, aproximaram-se dos dados de retenção descritos na literatura para a adsorção da BSA na resina Streamline DEAE® (TONG et al., 2003) e da lisozima na resina Streamline SP® (CHANG e CHASE, 1996; WRIGTH e

GLASSER, 2001). No entanto, os valores de D_p obtidos por regressão não-linear foram superiores aos por correlação. Segundo SARAIVA (2003), em valores de D_p superiores à ordem de 10^{-10} m²/s, a transferência de massa é extremamente rápida, sendo baixa a resistência à transferência de massa por difusão. Assim, modelos para adsorção de proteínas devem considerar a resistência à transferência de massa por difusão, a menos que a resistência à transferência de massa no filme seja muito maior que a resistência devida à difusão, o que normalmente não ocorre em processo de cromatografia. Os valores de D_p de proteínas em matrizes cromatográficas estão na ordem de 10^{-11} m²/s (Spieker et al., 1998).

Os valores de k obtidos por CRNL e RNL foram maiores em relação que os citados na literatura (WRIGTH e GLASSER, 2001), no entanto esses valores foram obtidos através de correlação numérica. Assim, valores acima de 5×10^{-4} m/s conduzem a uma cinética de adsorção lenta, e a transferência de massa no filme torna-se o fator limitante do processo (SARAIVA, 2003). Segundo GUIOCHON et al. (1994) a espessura do filme e, portanto, o coeficiente de transferência de massa são determinados pelas condições hidrodinâmicas e dependem da velocidade do líquido em torno da partícula.

Tabela 5 - Parâmetros de transferência de massa

Proteínas	Parâmetros de Transferência de Massa			
	CRNL		RNL	
	k (m/s)	D_p (m ² /s)	k (m/s)	D_p (m ² /s)
Conalbumina (mg/mL)				
0,5	$8,33 \times 10^{-4}$	$6,468 \times 10^{-11}$	$2,50 \times 10^{-3}$	$1,76 \times 10^{-9}$
1,0	$8,33 \times 10^{-4}$	$6,468 \times 10^{-11}$	$2,50 \times 10^{-3}$	$1,76 \times 10^{-9}$
Lisozima (mg/mL)				
0,5	$8,33 \times 10^{-4}$	$11,288 \times 10^{-11}$	$8,33 \times 10^{-6}$	$8,33 \times 10^{-8}$
1,0	$8,33 \times 10^{-4}$	$11,288 \times 10^{-11}$	$8,33 \times 10^{-6}$	$8,33 \times 10^{-8}$
Ovoalbumina (mg/mL)				
0,5	$4,10 \times 10^{-4}$	$7,647 \times 10^{-11}$	$2,50 \times 10^{-3}$	$8,33 \times 10^{-9}$
1,0	$4,10 \times 10^{-4}$	$7,647 \times 10^{-11}$	$2,50 \times 10^{-3}$	$8,33 \times 10^{-9}$

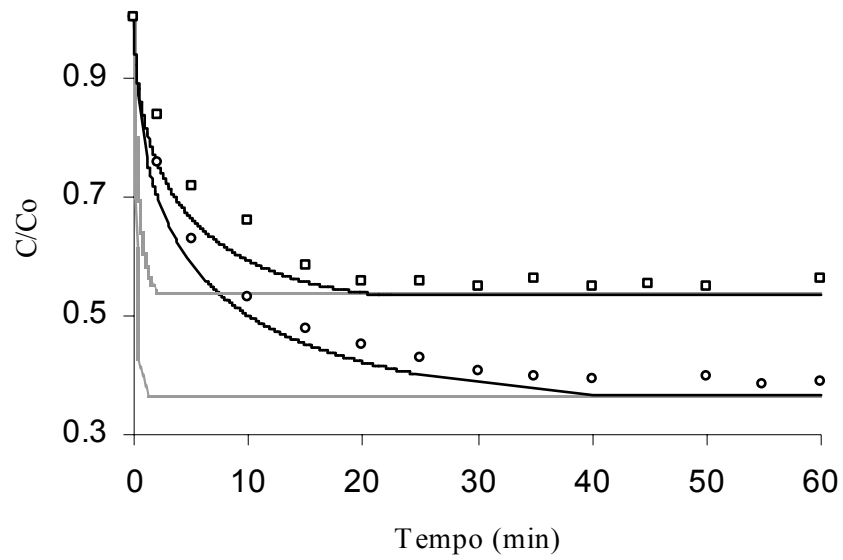


Figura 10 - Cinética de adsorção da ovalbumina em concentrações de (o) 0,5 e (□) 1,0 mg/mL. (---) RNL (—) CRNL.

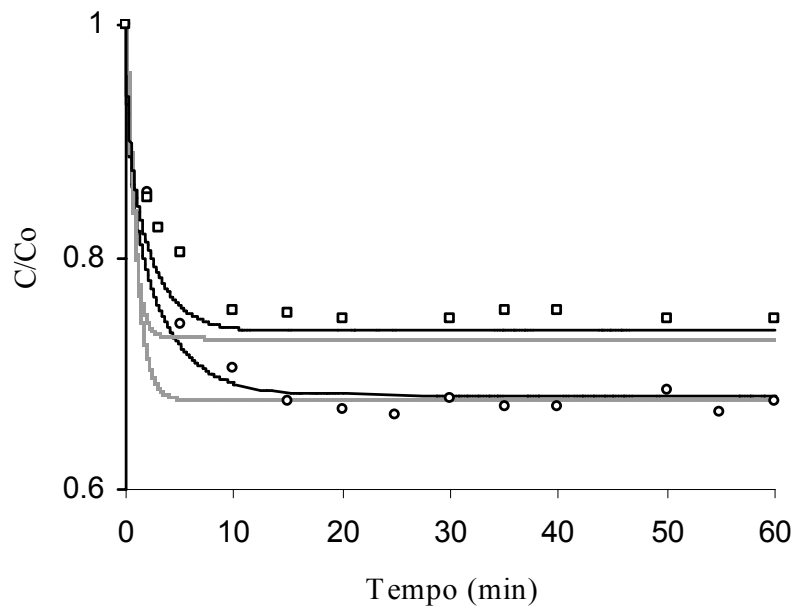


Figura 11 - Cinética de adsorção da lisozima em concentrações de (o) 0,5 e (□) 1,0 mg/mL. (---)RNL (—) CRNL.

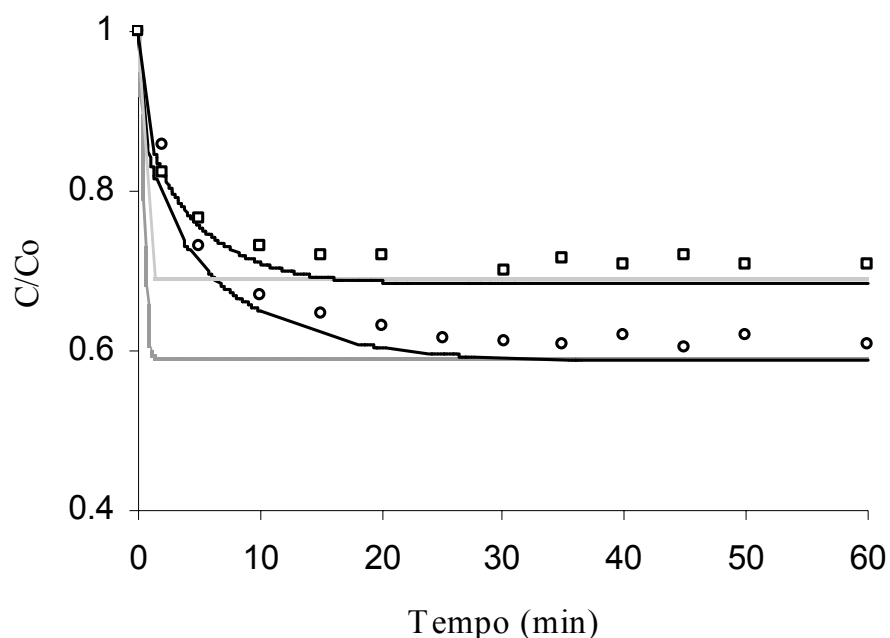


Figura 12 - Cinética de adsorção da conalbumina em concentrações de (o) 0,5 e (□) 1,0 mg/mL. (.....) RNL (—) CRNL.

4. Conclusões

- Os dados de equilíbrio de adsorção hidrofóbica para a lisozima, conalbumina e ovalbumina, em tanques agitados e a 25 ± 2 °C, foram influenciados pelo aumento nas concentrações de sais estudadas. O sal Na_2SO_4 apresentou, de forma geral, maior interação com as proteínas avaliadas favorecendo, assim, a sua adsorção, embora cada proteína exibisse uma interação diferenciada por cada um dos sais.
- Os três modelos de isotermas empregados (Langmuir, Langmuir exponencial e Chen e Sun) ajustaram-se bem aos dados de equilíbrio, não se encontrando diferença significativa entre eles no nível de 5%.
- O modelo de transferência de massa usado simulou corretamente o comportamento da cinética de adsorção das proteínas nas condições estudadas.

Lista de símbolos

- Q = quantidade de proteína adsorvido por unidade de massa de adsorvente (mg/g)
- q_m = quantidade máxima de soluto adsorvida na fase líquida (mg/g).
- C_p = concentração de proteína na fase líquida, no equilíbrio (mg/mL).
- k_d = constante de dissociação (mg/mL).
- C_s = concentração de sal (mol/L).
- b = parâmetro da Equação (2).
- k = parâmetro da Equação (2).
- λ = parâmetro da Equação (2).
- K_{ps} = constante de equilíbrio.
- N = números de sítios ligados.
- α = coeficiente do sal.
- σ = fator estérico.
- Λ = densidade do ligante (mol/L).
- t = tempo.
- C_{bi} = concentração do componente i na fase líquida extrapartícula.
- V_b = volume de líquido no tanque.
- V_p = volume de adsorvente no tanque.
- R_p = raio da partícula.
- R = coordenada radial para a partícula.
- C_{pi} = concentração do componente i na fase líquida intrapartícula.
- k_i = coeficiente de transferência de massa para o componente i (m/s).
- D_{pi} = componente de difusão do componente i (m²/s).
- C_{pi}^s = concentração do componente i na fase sólida da partícula.

- C_{oi} = concentração inicial na fase líquida.
- ε_p = porosidade da partícula.
- Mm = massa molar da proteína.
- m = número de pontos experimentais.
- p = número de parâmetros ajustados.
- δ_{exp} = valores experimentais dos dados de equilíbrio de adsorção.
- δ_{cal} = valores calculados dos dados de equilíbrio de adsorção.
- SD = desvio padrão (mg/mL).
- $RSSE$ = somatório relativo dos quadrados dos erros (%).

5. Referências Bibliográficas

ANTIA, F. D.; HORVATH, C. Gradient elution in non-linear preparative liquid chromatography **J. Cromatogr. A**. v. 484, p. 1-27, 1989.

ARAKAWA, T. Thermodynamic analysis of the effect of concentrated salts on protein interaction with hydrophobic and polysaccharide columns. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 248, p. 101-105, 1986.

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. **Biochemistry**, v. 21, p. 6545-6552, 1982.

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. **Biochemistry**, v. 23, p. 5912-5923, 1984.

AWADE, A. C.; MOREAU, S.; MOLLE, D.; BRULÉ, G.; MAUBOIS, J. L. Two-step chromatographic procedure for the purification of hen egg white ovomucin, ovotransferrin and ovalbumin and characterization of purified proteins. **J. Cromatogr. A** v. 677, p. 279-288, 1994.

CARRERE, H. **Extraction des protéines du lactosérum par chromatographie d'échange 'dions en lit fluifisé**. 1993. 210 f. Toulouse, França: Tese (Doutorado) - Institut National Polytechnique de Toulouse.

CHANG, Y. K.; CHASE, H. A. Development of operating conditions for protein purification using expanded bed techniques: the effect of the degree of bed expansion on adsorption performance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, p. 512-516, 1996.

CHEN, J.; SUN, Y. Modeling of the effects on hydrophobic adsorption equilibrium of protein **J. Chromatogr. A**, v. 992, p. 29-40, 2003.

CHEN, W-D.; DONG, X-Y.; SUN, Y. Modeling of the whole expanded-bed protein adsorption process with yeast cell suspensions as feedstock **J. Chromatogr. A**, v. 1012, p. 1-10, 2003.

CROGUENNEC, T.; FRANCOISE N.; PEZENNEC S.; BRULE G. Simple rapid procedure for preparation of large quantities of ovalbumin. **J. Agric. Food Chem.** v.46, p 4883-4889, 2000.

EL RASSI, Z. Recent progress in reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrate species. **J. Chromatogr. A**, v. 720, p. 93–118, 1996.

ERIKSSON, K-O. Hydrophobic interaction chromatography. In JANSON J-C, RYDÉN L. (Eds) **Protein purification: principles, high-resolution methods and applications**. Wiley-VCH, Inc, 1998 p. 283.

FAUSNAUGH, J. L.; REGNIER, F. E. Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. **J. Chromatogr. A**, v. 359, p. 131–146, 1986.

FERREIRA, R. C. **Separação de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina de proteínas do soro de queijo por adsorção em colunas de leito fixo**. Vicosa, MG: UFV, 2001. 81 f. Dissertação (Mestrado em ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GENG, X. D., GUO, L. A.; CHANG, J. Study of the retention mechanism of proteins in hydrophobic interaction chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 507, p. 1-23, 1990.

GRUND, E. Hydrophobic Interaction Chromatography of proteins. In SUBRAMANIAN G. (Ed.). **Bioseparation and bioprocessing**. Wiley-VCH, Inc, 1998, p. 65.

GÜNDÜZ, U. Evaluation of viscosities of aqueous two-phase systems containing protein. **J. Chromatogr. B**, v. 807, p. 157-161, 2004.

GUICHON, G., SHIRAZI, S. G.; KATTI, A. M. **Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography**. London: Academic Press, 1994. 697 p.

HORVATH, C., MELANDER W., MOLNAR I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. **J. Chromatogr. A**, v. 125, p. 129-156, 1976.

HORSTMANN, B. J.; CHASE, H. A. Modelling the affinity adsorption of immunoglobulin g to protein a immobilized to agarose matrices. **Chemical engineering research and design, Warwickshire**, v. 67, p.243-254, 1989.

LEVISON, P. R.; BADGER, S. E.; THOME, D. W.; KOSCIELNY, M. L.; LANE L.; BUTTS E. T. Economic considerations important in the scale-up of a ovalbumin separation from hen egg-white on the anion- exchange cellulose DE92. **J. Chromatogr. A**, v. 590, p. 49-58, 1992.

LI, P.; XIU, G.; RODRIGUES, A. E. Modeling separation of proteins by iner core adsorbent in a batch adsorber. **Chemical Engineering Sci.** v.58, p. 3361-3371, 2003.

LYDDIAT, A. Process chromatography: curret constraints and future options for the adsorptive recovery of bioproducts. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 95-103, 2002.

MAHN, A.; LIENQUEO, M. E.; ASENJO, J. A. Effect of surface hydrophobicity distribution on retention of ribonucleases in hydrophobicity interaction chromatography. **J. Chromatogr. A**, InPress,,2004.

MELANDER, W.; CORRADINI, D.; HORVATH, C. Salt mediated retention of proteins in hydrophobic interaction chromatography. Application of solvophobic theory. **J. Chromatogr. A**, v. 317, p. 67-85, 1984.

CHANG, S. K. C. Protein analisis, In NIELSEN S. S. (Ed.) **Food analysis**, 2. ed. Maryland; Aspen Publishers, Inc., p. 237, 1998.

PEREIRA, M. J. A. **Adsorção de beta-galactosidase de *Scopulariopsis sp.* em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a ampliação de escala.** Campinas, SP: UNICAMP, 1999. 138 f. Dissertação (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

POLSON, A. Some aspects of diffusion in solution and a definition of a colloidal particle. **J. Phys. Colloid Chem.** v. 54, p. 649-652, 1950.

PHARMACIA BIOTECH Hydrophobic Interaction Chromatography Principles and methods. Uppsala, Sweden, 1993.

QUEIROZ, J. A.; TOMAZ, C. T.; CABRAL J. M. S. Hydrophoic interaction chromatography of proteins. **J. Biotechnology**, v. 87, p. 143-159, 2001

SARAIVA, H. S. **Modelagem e simulação de processos de cromatografia preparativa.** Vicosá, MG: UFV, 2003. 102 f. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos) - Universidade federal de viçosa, Viçosa.

SPIEKER, A.; KLOPPENBURG C.; GILLES E.-D. Computer modeling of chromatographic bioseparation. In SUBRAMANIAN, G. (Ed.) **Bioseparation and bioprocessing** Wiley-VCH, Inc. 1998, p. 329.

TONG, X.-D.; XUE, B.; SUN, Y. Modeling of expanded-bed protein adsorption by taking into account the axial particle size distribution **Biochemical Engineering J.** v. 16 p. 265-272, 2003.

VACHIER, M. C.; PIOT, M.; AWADE, A. C. Isolation of hen egg white lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin, using a quaternary ammonium bound to a highly crosslinked agarose matrix. **J. Chromatogr. B**, v. 664, p. 201-210, 1995.

WONG, D. W. S. **Mechanism and theory in food chemistry**. New York, Van Nostrand Reinhold, 1989.

WRIGHT, P. R.; GLASSER, B.J. Modeling mass transfer and hydrodynamics in fluidized-Bed Adsorption of proteins. **AIChE Journal**, v.47, p. 474-488, 2001.

ZHANG, S. P.; SUN, Y. Ionic strength dependence of protein adsorption to dye-ligand adsorbents. **AIChE Journal**, v. 48, p. 178-186, 2002.