BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-graduação em

Ciência dos Alimentos

CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E FUNCIONAL DA
PROTEÍNA RECUPERADA DE CEFALOTÓRAX DE
CAMARÃO-ROSA E ESTUDO DO APROVEITAMENTO
DO PRODUTO RESIDUAL

ALFREDO TENUTA FILHO

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. SERGIO MIGUEL ZUCAS

São Paulo
1983

10753

A minha mãe, Alayde "in memoriam"

A meu pai, Alfredo

A minha esposa, Nanci e

As minhas filhas, Adriana e Andrea

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sergio Miguel Zucas, pela orientação deste trabalho.

Aos Drs. Odair Zenebon e Adelaide Tie Catutani, pela colaboração prestada.

Aos Srs. Oscar Barbosa e João da Penha, pelo auxílio recebido.

Ao Instituto Oceanográfico-USP, pelas facilidades colocadas ao nosso dispor.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, pela bolsa de estudo concedida (processo 110.324/78).

À Financiadora de Estudos e Projetos-FINEP, pelo auxílio financeiro.

As demais pessoas e entidades que, de uma forma ou de outra, colaboraram na realização do trabalho em questão.

SUMÁRIO

	pág.
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - OBJETIVOS	12
3 - PARTE EXPERIMENTAL	13
3.1 - Planejamento	13
3.2 - Materiais	14
3.2.1 - Amostra	14
3.2.2 - Animais	15
3.2.3 - Gaiolas	15
3.2.4 - Rações	15
3.3 - Métodos	16
3.3.1 - Recuperação da proteína	16
3.3.2 - Proteína isolada	17
3.3.3 - Proteína concentrada	17
3.3.4 - Preparação das rações	20
3.3.5 - Avaliação nutricional	20
3.3.5.1 - Avaliação química	20
3.3.5.1.1 - Proteína	20
3.3.5.2 - Avaliação biológica	21
3.3.5.1.2 - Ração	21
3.3.5.2.2 - Proteína	21

	pág.
3.3.6 - Propriedades funcionais	21
3.3.6.1 - Solubilidade	21
3.3.6.2 - Dispersibilidade	22
3.3.6.3 - Capacidade de emulsificação ..	22
3.3.6.4 - Estabilidade da emulsão	23
3.3.6.5 - Absorção de água e de óleo ...	24
3.3.7 - Isolamento da quitina	24
3.3.8 - Preparação da quitosana	25
3.3.9 - Métodos analíticos	25
3.3.10 - Análise estatística	26
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 - Método de recuperação de proteína	27
4.2 - Caracterização nutricional da proteína recupera- da	32
4.3 - Caracterização toxicológica do produto protéico recuperado	40
4.4 - Caracterização tecnológica da proteína recupera- da	41
4.4.1 - Solubilidade	42
4.4.2 - Dispersibilidade	49
4.4.3 - Capacidade de emulsificação e estabilida de da emulsão	51
4.4.4 - Absorção de água e absorção de óleo	54
4.5 - Caracterização do resíduo sólido gerado na recu- peração de proteína	57

	pág.
5 - CONCLUSÕES.....	63
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
RESUMO	76
SUMMARY	78

1 - INTRODUÇÃO

A ocorrência de resíduos numa indústria de alimentos, cujo volume depende da matéria-prima, processamento adotado, produto final, etc, faz com que medidas especiais sejam tomadas com referência ao destino a eles reservado. Esses resíduos podem ser aproveitados, parcial ou totalmente, ou descartados, modificados ou não previamente, de forma a não se constituírem poluentes. Certamente esta orientação será decidida por diferentes fatores, entre os quais os de ordem econômica⁽²⁸⁾.

A recuperação de substâncias de interesse nutricional e/ou não-nutricional, a partir de resíduos da indústria de alimentos, pode ser útil na alimentação humana e/ou animal e a outros propósitos. Pode ainda baixar o custo de insumos principais e diminuir problemas de poluição ambiental.

A indústria de pesca está agrupada entre as que geram grandes volumes de resíduos, constituindo-se num exemplo bastante típico a industrialização de crustáceos, pois seus resíduos atingem até 85% do peso inicial da espécie considerada^(14,32,50,61,65,78).

De um modo geral, a indústria de pesca local não aproveita racionalmente os resíduos de crustáceos⁽⁷⁸⁾.

Diante das opções de orientação a serem dadas a esses re

síduos, é bastante convincente a expectativa de torná-los uma outra fonte de matéria-prima. É importante que a partir dos mesmos seja tentado o seu uso integral ou a recuperação de nutrientes e/ou de outros constituintes, neles presentes, satisfazendo-se assim a oportunidade de se ter uma utilização mais completa da matéria-prima original.

Os resíduos sólidos de crustáceos são constituídos de partes dos animais convencionalmente não consumidas (cefalotórax, exoesqueleto, etc) e restos de músculo e vísceras, em quantidades variáveis, podendo ainda conter exemplares inteiros e mecanicamente danificados e/ou de tamanho inadequado para a industrialização e comercialização. Como decorrência, fazem-se presentes substâncias nutricionalmente interessantes, como a proteína, por exemplo, e outras que não apresentam tais características, como é o caso da quitina, pigmentos carotenóides e carbonato de cálcio.

Nos estudos realizados com resíduos de crustáceos, mereceram maior atenção a proteína e a quitina. A proteína existente nesse material pode ser distinguida em dois tipos, ou seja, (a) a derivada de estruturas moles (músculo e vísceras, principalmente) e (b) aquela que faz parte do exoesqueleto que recobre o animal e está intimamente associada à quitina e ao carbonato de cálcio.

A farinha é a forma mais empregada de aproveitamento dos resíduos de crustáceos, destinada exclusivamente à alimentação animal. Enquanto seus atributos nutricionais sugerem o referido emprego, o fator limitante continua sendo a grande proporção de exoesqueleto presente, acarretando altas quantidades de cálcio e quitina (39, 50, 51, 61, 65, 78, 80). Consta registrado na literatura que altas ingestões de cálcio por animais não são benéficas, porque

interferem na absorção de outros nutrientes e promovem graves manifestações tóxicas, dependendo da quantidade^(17,26,27,35,56,64).

Recomendações concernentes à utilização desses produtos indicam que os mesmos podem substituir a farinha de peixe, quando em combinação com outros suplementos protéicos, estando os teores de cálcio e fósforo apropriadamente ajustados^(50,61).

A possibilidade de uma redução média de 76% de exoesqueleto foi demonstrada, através de trituração e tamisação controladas, em farinhas de caranguejo azul - Callinectes sapidus e de "freshwater crayfish" - Procambarus clarkii. Consequentemente, o nível de cálcio removido atingiu 56% e 68%, respectivamente, e o teor protéico aumentou em proporções superiores a 100%⁽⁶¹⁾.

Enquanto tem-se dado ênfase à fração protéica dessas farinhas e justifica-se, através disso, o emprego das mesmas, estudo realizado com proteína integrante do exoesqueleto do camarão - Penaeus japonicus, caranguejo - Portunus trituberculatus e lagosta - Panulirus japonicus revelou que esta é constituída de muito baixas quantidades de cistina, lisina, metionina e triptofano⁽⁶³⁾, condicionando-a, por isso, a um reduzido valor nutricional.

Esta evidência reforça a vantagem em reduzir-se ao máximo a quantidade de exoesqueleto em farinhas de resíduos de crustáceos, porque além de baixar o nível de cálcio e quitina, eventualmente melhoraria a qualidade da proteína das mesmas.

Vários estudos foram conduzidos com a preocupação de isolar ou recuperar a proteína de resíduos industriais sólidos de crustáceos, tendo em vista a ampliação do potencial de aplicação desses produtos, através de métodos que envolvem tratamentos químicos e físicos associados.

A proteína de cefalotórax de camarão-rosa - Penaeus brasiliensis e Penaeus paulensis, por exemplo, foi isolada por solubilização alcalina (NaOH), sob aquecimento, e precipitação isoelétrica (pH 4,5) subsequente. O isolado protéico obtido mostrou uma boa distribuição em aminoácidos essenciais, frente à proteína-padrão da F.A.O./O.M.S.⁽²⁰⁾, e um valor biológico de 73% do observado para a caseína^(77,79).

Através de técnica semelhante, outros autores isolaram também a proteína de resíduos de camarão^(32,34,57), cujo material isolado exibiu um bom perfil de aminoácidos essenciais comparado à caseína⁽³²⁾.

Por tratamento com enzima proteolítica e polifosfato foi recuperada a proteína de cefalotórax de camarão-rosa - Penaeus brasiliensis, ao lado de substâncias flavorizantes. O material recuperado, quando adicionado de amido e gordura vegetal e transformado em flocos, mostrou-se adequado para a formulação de sopas desidratadas⁽¹⁴⁾.

Empregando a digestão autolítica, a proteína presente em resíduos de camarão foi recuperada na forma de peptonas, as quais, integrando meios de cultura, permitiram o crescimento de várias espécies de microrganismos, semelhantemente a meios de cultivo comerciais⁽⁷⁰⁾.

Uma outra forma usada de recuperação de proteína de resíduos de camarão, e também de espécimes de tamanho comercialmente não adequado, é através da separação mecânica de tecidos moles, com auxílio de um separador de carne ("flesh separator")⁽⁵³⁾. A proteína separada nestas condições e precipitada a pH 4,5, sob aquecimento, apresentou uma boa distribuição em aminoácidos essenciais, com

parada à farinhas de resíduos de camarão, tendo sido indicada como fonte proteica e de pigmentação, na alimentação de salmonídeos⁽⁶⁵⁾.

A quitina tem sua maior fonte nos fungos, sendo encontrada também em crustáceos, conforme já dito, em outros invertebrados marinhos, insetos e leveduras^(3,4,25).

Uma fonte marinha de quitina atualmente em destaque e importante pelo seu potencial alimentar é o "krill". O "krill" - Euphausia superba é um crustáceo herbívoro que ocorre em águas superficiais antárticas, mede de 4 a 6 cm de comprimento e pesa de 0,7 a 1,2 g, quando adulto e constitui a principal dieta de baleias, sendo também consumido por outros animais. A explosão populacional experimentada por esse crustáceo, em consequência da redução do número de baleias, provocada pela sobrepesca, criou um grande interesse na sua exploração e utilização. São estimadas em 100-500 milhões de toneladas/ano a quantidade de "krill" que pode ser capturada, o que contrasta com a produção mundial atual de pescado, a qual não ultrapassa aos 100 milhões de toneladas anuais^(2,45,59).

Obedecendo a um esquema de levantamento das potencialidades de aproveitamento do "krill", foram otimizadas as condições de isolamento de proteína de resíduos do referido crustáceo, originados na separação mecanizada de sua parte comestível, através da solubilização alcalina (NaOH) e precipitação isoelétrica (pH 5,7), auxiliada por aquecimento (90°C/5min) no caso do animal não ter sofrido cocção prévia⁽⁵⁹⁾.

A quitina é um polímero de unidades de N-acetil-D-glicosamina, quimicamente semelhante à celulose, estável, resistente e degradável enzimaticamente por diferentes organismos, entre os quais o humano. É insolúvel em água, ácidos e álcalis diluídos e solven

tes orgânicos comuns e solúvel em solventes especiais^(3,25,60).

Como a celulose, a quitina pode ser quimicamente modificada, dando origem a diferentes derivados de interesse. A quitosana, polímero de 2-deoxi-2-aminoglicose (poliglicosamina), é originada pela remoção de grupos acetila e representa o mais importante derivado da quitina. É uma poliamina alifática primária e comporta-se como um polieletrólito catiônico. A partir da quitosana também podem ser obtidos derivados importantes^(3,25).

Em virtude da quitina ocorrer em abundância na natureza e de ser renovável, paralelamente à expectativa da conversão de resíduos de crustáceos num recurso útil, nos últimos anos houve crescente interesse de exploração de toda a potencialidade de uso apresentada por esse polímero, provocando com isso um grande volume de trabalhos publicados e o registro de várias patentes^(3,25).

A realização de uma Conferência Internacional^(*) sobre a quitina e a quitosana, recentemente, comprova o interesse criado em torno dessas substâncias, ocasião em que foram expostos inúmeros trabalhos, cobrindo os mais variados aspectos.

No que se refere à obtenção da quitina a partir de resíduos de crustáceos, basicamente estão implicadas uma demineralização ácida e uma desproteínização alcalina, esquema em que está prevista a recuperação da proteína presente, destinada à alimentação animal. Uma sequência típica de processo comercial de extração da quitina e subprodutos de resíduos de crustáceos está demonstrada na Figura 1⁽³⁾.

(*) The First International Conference on Chitin/Chitosan, realizada pelo Massachusetts Institute of Technology (Sea Grant Program) e Massachusetts Science and Technology Foundation, em Boston, MS, USA, de 11 a 13 de abril de 1977.

Figura 1 - Extração da quitina e subprodutos de resíduos de crustáceos⁽³⁾.

(a) "Meat and bone separator"; (b) Alimentação animal ;
 (c) Reciclagem; (d) Opcional; (e) Dispensável, no caso
 do produto final ser a quitosana.

Neste processo, o tecido mole (músculo, vísceras, etc) , depois da matéria-prima ter sido triturada, é separado mecanicamente do exoesqueleto e sua proteína recuperada. Subseqüentemente, o exoesqueleto lavado e dessecado é tratado com HCl diluído para a remoção do cálcio. A proteína é removida do exoesqueleto desmineralizado com NaOH a 1%, por vinte e quatro horas, a temperatura ambiente e sob agitação, ou por meia a uma hora se aquecida a vapor. Quando a quitosana é o produto final desejado, a desproteínização e desacetilação são conduzidas numa única operação, com NaOH a 40-50%, a quente, imediatamente após a desmineralização.

As propriedades da quitina e de seus derivados são de interesse para diferentes áreas de aplicação. Atributos funcionais como a capacidade de emulsificação e a habilidade em carrear corante, por exemplo, apresentadas pela quitina microcristalina e quitina e quitosana, possibilitariam o emprego das mesmas na tecnologia de alimentos^(37,38).

Bastante interessante é o fato que relaciona a quitina microcristalina e alquilglicosídeos de N-acetil-D-glicosamina (fator de crescimento da bífido-bactéria produtora de lactase) com a intolerância à lactose e o aproveitamento do soro originado no fabrico de queijo, geralmente sub-utilizado em virtude do alto teor deste dissacarídeo. Foi possível adicionar o soro desidratado (20 e 30%) às rações de animais (frangos e ratos) sem a ocorrência de manifestações típicas de intolerância à lactose (severa diarreia, má nutrição, etc.), desde que estivessem também presentes nestas rações o propil-N-acetil-D-glicosamina (1,2%) ou a quitina microcristalina (2%)⁽⁴⁾.

Potencialidades de emprego da quitina e quitosana são

vistas também na área médico-cirúrgica, pelo fato de mostrarem-se efetivos aceleradores da cicatrização de ferimentos⁽⁶⁾. A quitosana, por deter propriedades hipolipidêmicas e hipocolesterolêmicas, quando presentes em níveis de 2 a 5% na dieta de ratos, abre novas perspectivas nos campos da nutrição e farmacologia^(55,71).

A quitosana é útil em processos cromatográficos (troca iônica, quelação, camada delgada, etc) de recuperação de aminoácidos, isolamento de enzima e separação de misturas de substâncias (corantes, fenois, aminoácidos, derivados de ácidos nucleicos e íons inorgânicos do grupo do cobre)^(54,75).

A quitosana, sendo também particularmente excelente na quelação ou captura de íons (Hg, Zn, Pb, Ag, Cr, Cu, entre outros), pode ter utilidade na remoção e determinação quantitativa de metais como o mercúrio, vanádio e molibdênio, na redução a níveis aceitáveis de tóxicos metálicos, presentes em efluentes líquidos, e na recuperação de cobalto, níquel e cobre de nódulos marinhos de manganês. Tanto a quitina-fosfato como a quitosana-fosfato são hábeis na recuperação de urânio de sistemas aquasos, como água do mar e água residual de mina de urânio^(3,30,47,54,62,86).

Por precipitar, em meio alcalino, como flocos gelatinosos que aprisionam partículas suspensas, clarificando assim as suspensões, a quitosana foi usada com sucesso na remoção de sólidos, em diferentes efluentes de processamento de alimentos, com a vantagem adicional de ser possível usar o material recuperado na alimentação animal^(3,9,10,11).

Filmes, fibras e filamentos são obtidos de quitina e/ou quitosana, cujas propriedades apontam empregos interessantes. Os

filmes de quitosana, por exemplo, devido sua alta densidade de carga, seriam orientados à eletrólise, como membrana trocadora de íons. Os filmes quitina serviriam como cobertura protetora de ferimentos e as fibras e filamentos como material de sutura cirúrgica^(3,4,5,6,60).

A afinidade da quitosana por produtos de celulose, realçada pela similaridade estrutural entre ambos, suporta muitas aplicações em potencial, tais como adesivo, aditivo, substâncias de revestimento e co-polímero em papel, algodão, etc.⁽³⁾.

Várias enzimas são insolubilizadas por imobilização em quitina e quitosana, como suportes físicos insolúveis, com inúmeras aplicações. Nesse particular, revelou-se bastante promissora a imobilização da papaína em quitina, empregada proteoliticamente na eliminação (solubilização) de complexos de proteína-carboidrato-tanino de cerveja, responsáveis pela turbidez do produto que ocorre durante o resfriamento e armazenamento^(23,46,72,73,74).

Na Tabela 1 constam relacionadas aplicações sugeridas para a quitosana, com base em suas principais propriedades⁽³⁾.

Tabela 1 - Aplicações sugeridas para a quitosana, em função de suas principais propriedades⁽³⁾.

Propriedades	Usos
Alta densidade de carga e capacidade potencial de ligação (em relação a celuloses substituídas)	Troca iônica ou quelação (cromatografia); recuperação de metais de efluentes residuais ; processo industrial de purificação de água para reciclagem; etc.
Formação de filmes	Membranas trocadoras de íons (eletrodiálise)
Coagulação	Tratamento de água residual
Forte ligação com polímeros negativamente carregados	Aditivo para o papel (aumento de resistência); fixador de corante e ligante (indústria textil); componente de invólucro de salsicha; adesivos
Promotora de cicatrização; não-trombogênica	Tratamento de ferimentos; adjuntos cirúrgicos

2 - OBJETIVOS

Considerando-se, com base no exposto, a importância dos resíduos industriais de crustáceos, como matéria-prima de interesse para o aumento da disponibilidade de proteína de origem animal e como fonte de quitina e derivados e, tendo-se em conta, conforme demonstrado, que o cefalotórax de camarão-rosa pode ser útil na alimentação^(14,77,78,79) e a oportunidade de ampliação de sua potencialidade de aplicação, em termos nutricionais e/ou não, o presente trabalho teve como objetivos:

- o desenvolvimento, em escala de laboratório, de um método de recuperação de proteína presente em cefalotórax de camarão -rosa, com baixos teores em quitina e cálcio;
- a caracterização nutricional, toxicológica (metais tóxicos) e tecnológica (propriedades funcionais) do produto protéico recuperado e
- a caracterização do resíduo sólido gerado na recuperação proteica em apreço, em termos químico-nutricional e como fonte de quitina e quitosana.

3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Planejamento

Para atender os objetivos programados, inicialmente foi desenvolvido o método de recuperação protéica e, em seguida, executada a caracterização do produto obtido e do resíduo sólido resultante.

O método em apreço teve como fundamento a separação física do material muscular e visceral, do exoesqueleto correspondente, e a insolubilização subsequente da proteína.

Definidas as condições para a sua recuperação, o produto derivado de cefalotórax de camarão-rosa foi então caracterizado nutricionalmente, toxicologicamente e tecnologicamente.

A caracterização nutricional foi executada através do cômputo químico dos aminoácidos essenciais, em relação à caseína e à proteína-padrão da F.A.O./O.M.S, e da comparação com a caseína (controle), em ensaio biológico, utilizando-se como índices o Coeficiente de Eficácia Protéica - C.E.P e o Coeficiente de Digestibilidade - C.D. Foram empregados, no referido ensaio, doze ratos albinos machos, recém-desmamados, com cerca de vinte e quatro dias de idade, com peso médio de quarenta e duas gramas e repartidos em dois grupos de seis animais. Sua duração foi de vinte e oito dias e, no seu transcurso, computou-se o peso dos animais no 1º, 7º, 14º,

219 e 289 dias, controlando-se também o consumo das rações e das fezes eliminadas pelos animais, a cada dois-três dias. Tanto a água como as rações foram oferecidas sem restrição.

Através da quantificação dos níveis de mercúrio, cádmio, chumbo, cobre e zinco, efetuou-se a caracterização toxicológica do produto recuperado, tendo-se em conta que o mesmo poderia estar acompanhado de quantidades incompatíveis dessas substâncias, principalmente por tratar-se de material concentrado, à custa da remoção de água e de lípidos.

As características tecnológicas da proteína recuperada foram avaliadas principalmente em função de sua solubilidade e da capacidade de emulsificação, considerando-se que com estas propriedades é possível visualizar a potencialidade de emprego da mesma.

E, por último, o resíduo resultante no processo de recuperação protéica estudado, composto basicamente de exoesqueleto, foi caracterizado através dos aminoácidos essenciais de sua fração protéica e do cálculo químico correspondente, em comparação à caseína e à proteína da F.A.O/O.M.S, e também como fonte de quitina e quitosana, parâmetros de importância na avaliação da potencialidade do material em questão.

3.2 - Materiais

3.2.1 - Amostra

As amostras de cefalotórax de camarão-rosa Penaeus brasiliensis e Penaeus paulensis foram obtidas numa indústria de pesca,

em Guarujá - SP, trituradas em moedor de carne (disco com perfurações de 8 mm de diâmetro) e congeladas (-25 a 20°C). As amostras destinadas ao estudo de propriedades funcionais não foram congeladas.

3.2.2 - Animais

No ensaio biológico foram usados ratos albinos (Rattus novergicus var. albinus), da raça Wistar, procedentes do biotério do Setor de Nutrição do Instituto de Ciências Biomédicas - USP.

3.2.3 - Gaiolas

Foram empregadas gaiolas individuais apropriadas, as quais permitiram o controle do consumo de rações e fezes eliminadas pelos animais⁽⁸⁷⁾.

3.2.4 - Rações

A ração básica era composta de sacarose (10%), óleo de soja (8%), mistura vitamínica (1%), mistura salina (4%), celulose (1%), ácido benzóico (0,1%) e amido de milho⁽³¹⁾. A quantidade de amido empregada foi a necessária para completar a 100% as rações, controle e experimental, após a incorporação de caseína e proteína de camarão, a nível protéico de 10%.

3.3 - Métodos

3.3.1 - Recuperação da proteína

- A amostra triturada (250g) e homogeneizada com cerca de 500 ml de água potável foi filtrada em tamis metálico (0,177 mm²).
- O resíduo resultante foi homogeneizado com cerca de 500ml de água e prensado (manualmente) contra uma superfície metálica perfurada, com orifícios de 1 mm de diâmetro, até que todo líquido tenha sido drenado. Para o mesmo propósito e por questões comparativas, foi empregada também a filtração em centrífuga-de-cesto (Turmix; orifícios de 1 mm de diâmetro ; 2.500 r.p.m). O material obtido, tanto numa como noutra operação, foi em seguida filtrado em tamis.
- O material tamisado, reunido entre si, foi decantado com vistas à eliminação de areia e de pequenos fragmentos de exoesqueleto, não retidos na filtração empregada.
- A proteína presente no material filtrado e decantado foi insolubilizada por precipitação isoelétrica (pH 4,5) auxiliada por aquecimento a 70-75⁰C/5 min, em banho-maria. Com propósitos comparativos, a proteína foi insolubilizada também por precipitação isoelétrica (pH 4,5), unicamente, e pelo uso de hexametáfosfato de sódio. Na precipitação com fosfato, este foi adicionado na proporção de 1g/100g de amostra fresca inicial e o pH ajustado para 3,8-4,0⁽⁶⁹⁾.

- O excesso de acidez e os produtos solubilizados foram removidos por três operações sucessivas de sedimentação da proteína precipitada, durante duas a cinco horas, eliminação do sobrenadante por sucção e adição de cinco partes de água potável para cada uma de material sedimentado.
- A proteína em suspensão foi, por fim, recolhida por centrifugação semicontínua (Centrífuga Sharples mod. T1; 12000 rpm), dessecada a 45°C/16-20 horas, em estufa, sob corrente forçada de ar, triturada, tamisada (malha de 0,297 mm²), acondicionada em saco plástico e mantida a temperatura ambiente.
- O fluxograma do processo em questão consta na Figura 2.

3.3.2 - Proteína isolada

A proteína foi isolada por meio de duas extrações alcalinas (NaOH) sucessivas (3% e 2%, respectivamente, a 70-71°C) e precipitação a pH 4,5⁽⁷⁷⁾.

3.3.3 - Proteína concentrada

A proteína concentrada, destinada ao estudo de propriedades funcionais, foi preparada conforme a seguir:

- Recuperada por precipitação a pH 4,5/70-75°C/5 min, dessecada a 45°C e triturada, conforme o item 3.3.1, e desengordurada com éter etílico (amostra I).

Figura 2 - Recuperação de proteína de cefalotórax de camarão-rosa

- Isolada com álcali, conforme o ítem 3.3.1, e desengordurada com éter etílico (amostra II).
- Recuperada por precipitação a pH 4,5/70-75°C/5 min, conforme o ítem 3.3.1, mas não dessecada e nem desengordurada (amostra III).
- Recuperada por precipitação a pH 4,5/70-75°C/5 min, conforme o ítem 3.3.1, e desengordurada com etanol antes da dessecação a temperatura ambiente (amostra IV).
- Recuperada por precipitação a pH 4,5/70-75°C/5 min, conforme o ítem 3.3.1, desengordurada com etanol e ajustada a pH 8,5 (NaOH) antes da dessecação a temperatura ambiente (amostra V).
- Recuperada por precipitação unicamente a pH 4,5 (sem aquecimento), conforme o ítem 3.3.1, desengordurada com etanol e ajustada a pH 8,5 (NaOH) antes da dessecação a temperatura ambiente (amostra VI).

As amostras que foram desengorduradas, com éter ou com etanol, exibiram níveis de lípidos totais inferiores a 0,6%. As amostras V e VI, submetidas a pH 8,5 antes da dessecação, apresentaram pH 7 quando suspensas em água.

3.3.4 - Preparação das rações

Após a formulação e homogeneização de seus componentes (3.2.4), as rações controle e experimental foram granuladas^(42, 87) e mantidas sob refrigeração (0-5°C). A composição química das mesmas foi introduzida na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição química das rações, em g/100 g de amostra

Componentes	Caseína	Proteína recuperada
Umidade	7,49 $\pm$ 0,04	6,84 $\pm$ 0,04
Cinza	3,67 $\pm$ 0,07	3,87 $\pm$ 0,03
Proteína	11,36 $\pm$ 0,11	10,55 $\pm$ 0,06
Extrato etéreo	7,93 $\pm$ 0,17	7,02 $\pm$ 0,02
Fibra	1,08 $\pm$ 0,09	0,99 $\pm$ 0,04
Carboidratos	68,47	70,73

3.3.5 - Avaliação nutricional

3.3.5.1 - Avaliação química

3.3.5.1.1 - Proteína

Através da quantificação dos aminoácidos essenciais (A.A.E) e do cálculo químico correspondente, em relação à caseína⁽²⁴⁾ e à proteína-padrão da F.A.O/O.M.S⁽²⁰⁾. Cálculo químico =

= (mg do A.A.E em 1 g da proteína em estudo/mg do mesmo A.A.E na proteína-padrão) x 100⁽²⁰⁾.

3.3.5.2 - Avaliação biológica

3.3.5.2.1 - Ração

Pela determinação do Coeficiente de Eficácia Alimentar - C.E.A, que significa o aumento do peso do animal em razão da ração ingerida⁽⁴¹⁾.

3.3.5.2.2 - Proteína

Através do Coeficiente de Eficácia Protéica - C.E.P, que representa o aumento de peso do animal em função da proteína ingerida na ração⁽³¹⁾, e do Coeficiente de Digestibilidade - C.D, que significa o percentual aparente da proteína absorvida, observada entre a ingerida na ração e a eliminada nas fezes⁽²⁹⁾.

3.3.6 - Propriedades funcionais

3.3.6.1 - Solubilidade

A amostra contendo 360 mg de proteína, anteriormente tamisada (0,177 mm²), foi solubilizada em água ajustada a distintos valores de pH (2 a 12), com HCl ou NaOH diluídos, em balão vo

lométrico de 100 ml de capacidade, sob agitação eletromagnética , durante uma hora e a temperatura ambiente (22-26°C). A suspensão obtida foi centrifugada a 12.000 G/30 min e a proteína solúvel determinada no sobrenadante líquido. O método usado é similar aos empregados por outros autores^(18,36,52,58,84).

3.3.6.2 - Dispersibilidade

Cerca de 0,5 g da amostra tamisada (0,177 mm²) foi homogeneizada com água (a pH 7; ajustada com NaOH diluído quando necessário), em balão volumétrico de 100 ml de capacidade, sob agitação eletromagnética, durante quinze minutos. Em seguida, foi transferida para uma proveta de 100 ml de capacidade e deixada em repouso por duas horas, a temperatura ambiente (22-26°C), para a sedimentação das partículas e o equilíbrio da suspensão. Findo o referido tempo, uma alíquota de 5 ml da suspensão foi tomada da altura média da proveta, para a determinação do teor protéico⁽⁵⁸⁾.

3.3.6.3 - Capacidade de emulsificação

A capacidade das proteínas estudadas em estabilizar uma emulsão do tipo "óleo em água" foi verificada através de um sistema modelo tomado como base⁽⁴⁹⁾, ao qual introduziram-se as modificações necessárias. Para isso, 25 ml de solução ou suspensão protéica, a pH 7, contendo 0,4g de proteína/100 ml, colocados em bequer de 150 ml de capacidade, foram adicionados de óleo de soja co

mercial, com auxílio de funil de separação, numa velocidade média de 9,3 a 10,0 ml/20 seg, enquanto a mistura era vigorosamente emulsionada com um homogeneizador Superohm (velocidade 1; haste de 20 mm de diâmetro), a temperatura ambiente (22-26°C). A cada adição de 9,3 a 10,0 ml de óleo a homogeneização foi interrompida, para que não houvesse sensível elevação da temperatura e para que a mistura aderida à parede do bequer pudesse ser devolvida ao fundo do mesmo. A adição de óleo foi interrompida no momento da queda da viscosidade da emulsão formada, medida por viscosímetro (Brookfield, modelo RVT; haste 3; velocidade 10 rpm), provocada pela inversão das fases (ponto de colapso). A capacidade de emulsificação foi expressa em ml de óleo emulsionado/100 mg de proteína em solução ou suspensão.

3.3.6.4 - Estabilidade da emulsão

A emulsão formada (3.3.6.3) foi transferida para tubos de centrífuga, de 50 ml de capacidade, deixada em repouso por uma hora, a temperatura ambiente (22-26°C) e centrifugada (1.085G/10min). A quantidade de óleo liberada foi pesada e convertida em volume ($d = 0,9$). A estabilidade foi expressa como o percentual do óleo que permaneceu emulsionado nas condições do teste. As condições adotadas formam, de certo modo, a base de métodos destinados a avaliar a estabilidade de emulsões⁽³⁶⁾. O tempo de repouso foi escolhido tendo-se em vista que algumas emulsões apresentavam sinais iniciais de separação das fases aos quarenta minutos após a formação das mesmas.

3.3.6.5 - Absorção de água e de óleo

A amostra (0,5g) tamisada ($0,177 \text{ mm}^2$) foi homogeneizada com 5g de água ($d = 1,0$) ou com 5g de óleo de soja comercial ($d = 0,9$), deixada em repouso por 30 minutos, a temperatura ambiente ($22-26^\circ\text{C}$), e centrifugada a $12.100 \text{ G}/30 \text{ min}$. No lugar de remover criteriosamente o sobrenadante e medi-lo, de acordo com o método tomado por base⁽¹⁸⁾, pesou-se a amostra absorvida de óleo ou de água, efetuando-se a correção relativa aos sólidos solubilizados no sobrenadante, no caso desta última. A diferença observada no peso da amostra, antes e após o tratamento, significou a água ou o óleo absorvidos pela mesma e que foram expressos em ml/grama de proteína.

3.3.7 - Isolamento da quitina

A quitina foi isolada de maneira similar à maioria dos métodos^(2,3,6,60). O resíduo obtido em 3.3.1 (10,0g), dessecado e tamisado ($0,297 \text{ mm}^2$), foi desmineralizado com HCl diluído, em quantidade que excedeu em 10% a necessária para transformar todo o CaCO_3 contido na amostra em CaCl_2 , numa relação sólido/solvente de 1:20, sob agitação eletromagnética, por duas horas, a temperatura ambiente ($22-26^\circ\text{C}$). A acidez e o cálcio solúvel foram removidos por sucessivas lavagens com água e centrifugações. A amostra descalcificada foi desproteïnizada por adição de água e NaOH até uma concentração de soda de 3,5%, numa relação sólido/solvente de 1:10, e aquecimento a $95^\circ\text{C}/2 \text{ h}$ em balão de fundo chato adap

tado a um condensador, sob agitação eletromagnética. A soda e substâncias solúveis foram eliminadas com lavagens com água e centrifugações sucessivas. A quitina isolada foi dessecada em temperatura ambiente (22-26°C).

3.3.8 - Preparação da quitosana

O resíduo obtido em 3.3.1 (10,0 g), dessecado e tamisado (0,297 mm²), foi desmineralizado conforme o previsto em 3.3.7 e tratado em balão de fundo chato, de 250 ml de capacidade, com 53,5 g de KOH dissolvidas em uma solução composta de 48,5 ml de etanol a 95% e 34,5 ml de etilenoglicol, a temperatura de refluxo, por vinte horas e sob agitação eletromagnética. A mistura, ainda quente, foi diluída com 1000 ml de água, deixada sedimentar e o sobrenadante eliminado por sucção. A quitosana obtida foi adicionada de água e centrifugada, por várias vezes, até a neutralidade do sobrenadante, e dessecada em temperatura ambiente (22-26°C)⁽²⁾.

3.3.9 - Métodos analíticos

As determinações de umidade, extrato etéreo, cinza, proteína (micro-Kjeldahl) e fibra foram efetuadas por métodos apropriados⁽³¹⁾. Os carboidratos foram quantificados por cálculo (diferença), em relação aos demais componentes. A cinza sulfatada correspondeu àquela tratada com H₂SO₄, re-incinerada e pesada como CaSO₄ e a cinza corrigida representou o CaCO₃, obtido por cálculo a par-

tir do CaSO_4 ⁽⁵⁷⁾. A sílica significou a cinza insolúvel em HCl a 5%⁽³¹⁾.

A quitina foi dosada gravimetricamente após desproteíni-zação e desmineralização⁽⁶⁸⁾. Calculou-se a proteína aparente multiplicando-se o nitrogênio quitinoso por 6,25, considerando-se um teor do mesmo na quitina de 6,89%^(2,61). A proteína subtraída da proteína aparente resultou na proteína corrigida.

O cálcio foi dosado por método que envolveu sua precipitação como cloranilato⁽²²⁾ e o mercúrio⁽¹⁾, cádmio, chumbo, cobre e zinco⁽¹⁹⁾ por espectrofotometria de absorção atômica. Os amino-ácidos foram quantificados em colunas de troca iônica, no Autoanalyzer Beckman modelo 120C, após hidrólise ácida⁽⁷⁾, sendo, no caso do triptofano, usada a digestão com ácido p-toluenosulfônico 3N⁽⁴⁴⁾, no lugar do HCl 6N. Os lípidos totais foram avaliados gravimetricamente, após sua extração com mistura de clorofórmio e metanol⁽⁶⁷⁾.

3.3.10 - Análise estatística

A análise estatística correspondente ao Coeficiente de Eficácia Alimentar - C.E.A e ao Coeficiente de Eficácia Protéica - C.E.P foi efetuada por comparação entre médias dos grupos de animais, através do teste "t" de STUDENT e FISHER⁽³³⁾.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Método de recuperação de proteína

O método empregado na recuperação de proteína, principalmente muscular e visceral, de cefalotórax de camarão-rosa baseou-se em sua separação física e subsequente insolubilização.

A separação física mencionada foi desenvolvida sujeitando-se a amostra triturada (250g) e homogeneizada com água potável (500 ml) a uma filtração inicial em tamis. O resíduo obtido na operação anterior foi homogeneizado com água (500 ml) e submetido a prensagem ou a filtração-centrífuga, sendo o material líquido resultante filtrado em tamis. O objetivo do emprego desses dois métodos de separação foi o de comparar a eficiência de ambos, no processo de recuperação protéica, e selecionar aquele que melhor conveniência apresentasse.

Conforme as informações colhidas e registradas na Tabela 3, recuperou-se a mesma quantidade de proteína de cefalotórax, independente de ser o método de separação empregado a prensagem ou a filtração-centrífuga. Com base nessa observação, nos estudos subsequentes utilizou-se a prensagem, por considerá-la mais viável do ponto de vista prático.

Tabela 3 - Eficiência da prensagem e da filtração-centrífuga na recuperação de proteína de cefalotórax de camarão-rosa, em g/100g de amostra fresca (a).

Resultados	Prensagem			Filtração-centrífuga		
	Sólidos recuperados	Proteína g/100g de sólidos	Proteína recuperada	Sólidos recuperados	Proteína g/100g de sólidos	Proteína recuperada
Mínimo	3,70	55,00	2,08	3,70	52,00	2,03
Máximo	4,00	58,00	2,32	4,20	57,40	2,36
Médio	3,91	56,08	2,19	3,99	55,11	2,20
D.P	±0,12	± 0,99	±0,08	±0,15	± 1,89	±0,12

(a) Proteína insolubilizada por precipitação a pH 4,5 auxiliada por aquecimento a 70-75°C/5 minutos.

Durante o desenvolvimento do presente método, verificou-se que todas as amostras utilizadas, sem nenhuma exceção, apresentaram-se contaminadas com areia, a qual, por não ser retida na filtração empregada, integrava o produto protéico recuperado em elevados níveis. Esta contaminação pode estar associada com a técnica de captura empregada e/ou com as operações industriais propriamente ditas, dada a contingência de o cefalotórax ser um resíduo não aproveitável.

Este problema foi convenientemente resolvido quando empregou-se a decantação do material filtrado, possibilitando inclusive a remoção dos fragmentos de exoesqueleto que atravessaram o tamis.

A insolubilização da proteína presente no filtrado, com vistas a seu posterior recolhimento por sedimentação e centrifugação, foi estudada comparativamente através da precipitação isoelétrica (pH 4,5), auxiliada ou não por aquecimento a 70-75°C/5 min ,

e precipitação com hexametáfosfato de sódio, a pH $3,9 \pm 0,1$.

Tendo-se em conta a quantidade de proteína recuperada e não-recuperada, constatou-se que a precipitação isoelétrica auxiliada por aquecimento apresentou-se mais eficiente (Tabela 4), sendo, por esse motivo, adotada na metodologia desenvolvida. A insolubilização por precipitação isoelétrica e aquecimento e pelo uso de hexametáfosfato de sódio, ao contrário da precipitação isoelétrica somente, proporcionaram fácil sedimentação da proteína precipitada, o que foi útil na remoção do sobrenadante por sucção.

Tabela 4 - Eficiência da precipitação a pH 4,5 (pHi), da precipitação a pH 4,5 auxiliada por aquecimento a $70-75^{\circ}\text{C}/5\text{min}$ (pHi Δ) e da precipitação com hexametáfosfato de sódio, a pH $3,9 \pm 0,1$ (HMF), na recuperação de proteína de cefalotórax de camarão-rosa, em g/100g de amostra fresca.

Resultados	Proteína recuperada			Proteína não-recuperada (a)		
	pHi	pHi Δ	HMF	pHi	pHi Δ	HMF
Mínimo	1,64	2,08	2,05	0,45	0,04	0,11
Máximo	1,72	2,32	2,10	0,57	0,07	0,14
Médio	1,68	2,19	2,08	0,51	0,06	0,13
D.P	$\pm 0,04$	$\pm 0,08$	$\pm 0,03$	$\pm 0,06$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$

(a) Precipitável com ácido tricloroacético a 20% (1:1).

Com base no que foi exposto, preconiza-se para a recuperação de proteína de cefalotórax de camarão-rosa, a filtração em tamis ($0,177\text{ mm}^2$) e a prensagem (perfurações de 1 mm de diâmetro) para separar fisicamente o material muscular e visceral do exoesqueleto equivalente; a decantação para eliminar a areia e o exoesqueleto finamente dividido; a precipitação isoelétrica (pH 4,5) e

o aquecimento (70-75°C/5 min) para a insolubilização; a sedimentação/sucção do sobrenadante/adição de água para reduzir a acidez e eliminar substâncias solúveis e a sedimentação e centrifugação para seu recolhimento, conforme consta descrito no item 3.3.1 e ilustrado na Figura 2.

O rendimento da proteína recuperada, nas condições apontadas, foi comparado em relação ao obtido com a proteína isolada em meio alcalino⁽⁷⁷⁾, com a finalidade de melhor avaliar esse parâmetro. Evidenciou-se que o rendimento da proteína recuperada foi de 2g para cada 100g de cefalotórax, ou de 8% em relação aos sólidos totais existentes na amostra fresca (24,43g/100g), atingindo 63% do obtido pela proteína isolada com álcali (Tabela 5).

Tabela 5 - Rendimento da proteína obtida de cefalotórax de cama - rão-rosa, em g/100g de amostra fresca.

Resultados	Recuperada (a)	Isolada (b)
Mínimo	2,08	3,26
Máximo	2,32	3,62
Médio	2,19	3,44
D.P.	±0,08	±0,25

(a) Segundo o método preconizado no presente trabalho

(b) Através de duas extrações sucessivas com NaOH (3 e 2%), a 70-71°C, e precipitação a pH 4,5 (3.3.2).

Conforme já apontado, é interessante mencionar que a quantidade de proteína pode variar de uma para outra amostra. Uma evidência desse fato é notada nos resultados de TENUTA FILHO e ZUCAS⁽⁷⁷⁾, que obtiveram um rendimento de 4g/100g de cefalotórax, nas mesmas condições. Portanto, cabe observar que essa considera

ção deve estar presente na análise do rendimento da proteína recuperada através do processo aqui proposto.

Deve ser considerado ainda, que o maior rendimento registrado para o isolado protéico (Tabela 5) é devido também à dissolução alcalina da proteína, que remove inclusive aquela integrante do exoesqueleto, ao passo que no processo estabelecido neste trabalho não há solubilização, mas sim um simples arraste da mesma pela água.

Os resultados da Tabela 6 indicam que é possível recuperar a proteína de cefalotórax de camarão-rosa com baixos teores em cálcio e quitina, o que se torna bastante evidente quando procede-se a comparação do referido material com a amostra que lhe deu origem.

Tabela 6 - Cálcio e quitina presentes no cefalotórax de camarão-rosa e no produto protéico recuperado a partir do mesmo, em g/100g de amostra seca.

Resultados	Cefalotórax			Produto protéico recuperado	
	Cálcio	CaCO ₃	Quitina	Cálcio	Quitina
Mínimo	8,33	20,80	14,00	0,030	0,49
Máximo	8,58	21,43	14,90	0,035	0,60
Médio	8,44	21,08	14,32	0,032	0,54
D.P	±0,13	± 0,32	± 0,50	±0,002	±0,05

Através do método proposto, também é possível recuperar pigmentos carotenóides, uma vez que precipitam juntamente com a proteína, à semelhança da técnica usada por SIMPSON⁽⁶⁵⁾, para os quais há interesse na aquicultura, como fonte protéica e de pigmentação.

4.2 - Caracterização nutricional da proteína recuperada

Caracterizou-se nutricionalmente a proteína recuperada de cefalotórax de camarão-rosa através de sua composição química básica, de seus aminoácidos essenciais e do cômputo químico correspondente, em relação à caseína⁽²⁴⁾ e à proteína-padrão da F.A.O./O.M.S.⁽²⁰⁾, e do ensaio biológico, usando-se a caseína como proteína controle.

A composição química básica do produto protéico recuperado integral revela que são relativamente altos os níveis de proteína e principalmente o de lípidos (extrato etéreo), ao mesmo tempo que bastante expressivos os baixos teores de sílica, cálcio e quitina, conforme pretendia-se. O alto nível lipídico registrado é decorrente do mesmo ser acumulado principalmente no hepatopâncreas do animal. O produto desengordurado acompanhou caracteristicamente a composição de concentrados protéicos de pescado, ou seja, mostrou-se com alto teor em proteína e praticamente isento de lípidos (Tabela 7).

Analisando-se a composição da proteína recuperada, nota-se, na Tabela 8, que é boa a distribuição de seus aminoácidos essenciais, comparada com a da caseína⁽²⁴⁾ e com a da proteína da F.A.O./O.M.S.⁽²⁰⁾, principalmente. O valor nutricional da proteína de camarão, estimado com base no cômputo químico dos aminoácidos essenciais, foi de 54% em relação à caseína, provocado pela limitação primária em triptofano (46%). Essa proteína apresentou-se ainda limitada em lisina (30%) e leucina (22%), respectivamente segundo e terceiro aminoácidos limitantes. Todavia, quando em relação à proteína-padrão da F.A.O./O.M.S.⁽²⁰⁾, a referida proteína exibiu um valor nutricional de 90%, limitado unicamente pelo triptofano (10%).

Tabela 7 - Composição química do produto protéico recuperado de ce
falotôrax de camarão-rosa, em g/100g de amostra.

	Integral	Desengordurado com éter etílico
Umidade	8,01 $\pm$ 0,15	8,65 $\pm$ 0,10
Cinza	2,06 $\pm$ 0,08	3,59 $\pm$ 0,09
Silica	0,20 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,04
Cálcio	0,03 $\pm$ 0,002	0,04 $\pm$ 0,002
Proteína corrigida	54,60	83,16
Proteína	54,81 $\pm$ 0,25	83,43 $\pm$ 0,40
Proteína aparente	0,21	0,27
Extrato etéreo	33,58 $\pm$ 0,37	1,03 $\pm$ 0,06
Quitina	0,50 $\pm$ 0,05	0,62 $\pm$ 0,09

Tabela 8 - Aminoácidos essenciais da proteína recuperada de cefalotórax de camarão-rosa e o cômputo químico correspondente, em relação à caseína⁽²⁴⁾ e à proteína-padrão da F.A.O/O.M.S.⁽²⁰⁾.

Aminoácidos essenciais	Proteína re- cuperada	Caseína		F.A.O/O.M.S.	
	g/100g proteína	g/100g proteína	Cômputo químico	g/100g proteína	Cômputo químico
Isoleucina	5,55	5,52	100	4,00	139
Leucina	7,61	9,71	78	7,00	109
Lisina	5,77	8,29	70	5,50	105
Metionina + cistina (a)	4,47	3,22	139	3,50	128
Fenilalanina + tirosina (a)	11,59	11,28	103	6,00	193
Treonina	4,66	4,75	98	4,00	116
Triptofano	0,90	1,65	54	1,00	90
Valina	5,96	6,88	87	5,00	119

(a) Cistina e tirosina considerados não-essenciais.

Na Tabela 9, reuniram-se os resultados concernentes à composição e qualidade da proteína de camarão, derivada de resíduos industriais sólidos e líquidos, com a finalidade de compará-los entre si.

Considerando-se a proteína examinada no presente trabalho e a estudada por TENUITA FILHO e ZUCAS⁽⁷⁷⁾, derivadas de igual resíduo (cefalotórax de camarão-rosa), mas obtidas por métodos diferentes, evidencia-se que ambas apresentam praticamente o mesmo valor nutricional, com base no cálculo químico, embora limitadas por aminoácidos distintos (triptofano e metionina + cistina). Em relação às demais, a proteína recuperada de cefalotórax de camarão-rosa, se não foi semelhante, mostrou-se nutricionalmente superior (Tabela 9).

Pela composição em aminoácidos essenciais e qualidade nutricional das amostras de proteína obtidas de resíduos industriais de camarão, conforme Tabela 9, é lícito que se tente o aproveitamento da mesma para fins alimentares. De um modo geral, as variações verificadas nas quantidades dos aminoácidos, entre os diferentes produtos da referida tabela, sugerem que sejam decorrentes do resíduo empregado e/ou do processo de obtenção.

De acordo com os resultados reunidos na Tabela 10, procedentes do ensaio biológico, realizado com vistas ao estabelecimento da qualidade nutricional da proteína recuperada de camarão-rosa, verifica-se que o seu Coeficiente de Eficácia Alimentar - C.E.A foi de 73,5%, o Coeficiente de Eficácia Protéica - C.E.P de 81,5% e o Coeficiente de Digestibilidade - C.D de 87%, em relação aos coeficientes correspondentes exibidos pela proteína-controle. Com base na eficiência com que a proteína estudada promo

Tabela 9 - Aminoácidos essenciais de proteína derivada de resíduos de camarão, em g/100g de proteína, e o cômputo químico correspondente (entre parêntese) em relação à proteína-padrão da F.A.O./O.M.S.

Aminoácidos essenciais	Proteína recuperada (a,b,c)	TENUTA FQ/ ZUCAS(77) (b,d)	JOHNSON/ PENISTON (32) (d)	SIMPSON (65) (c)	TOMA / JAMES(81) (e)	VENUGOPA LAN e cols.(82) (f)	F.A.O./O.M.S (20)
Isoleucina	5,55 (139)	5,42 (135)	5,17 (129)	4,68 (117)	3,26 (81)	4,2 (105)	4,00
Leucina	7,61 (109)	8,44 (120)	8,14 (116)	8,10 (116)	7,57 (108)	6,8 (97)	7,00
Lisina	5,77 (105)	6,68 (121)	8,34 (152)	7,36 (134)	6,17 (112)	8,9 (162)	5,50
Metionina + cistina (g)	4,47 (128)	2,90 (83)	2,60 ^h (74)	2,62 ^h (75)	4,43 (127)	3,9 ^h (111)	3,50
Fenilalanina + tirosina (g)	11,59 (193)	9,57 (159)	8,66 (144)	7,32 (122)	8,20 (137)	7,3 (122)	6,00
Treonina	4,66 (116)	3,95 (99)	3,91 (98)	4,65 (116)	4,28 (107)	2,5 (62)	4,00
Triptofano	0,90 (90)	1,38 (138)	0,73 (73)	— —	1,26 (126)	0,4 (40)	1,00
Valina	5,96 (119)	4,75 (95)	5,62 (112)	5,02 (100)	4,42 (88)	5,5 (110)	5,00

(a) Presente trabalho

(b) Cefalotórax de camarão-rosa (P. brasiliensis e P. paulensis)

(c) Recuperada por separação física e precipitação a pH 4,5 e aquecimento

(d) Isolada por solubilização com álcali e precipitação a pH 4,5

(e) Recuperada de efluente líquido industrial por precipitação a pH 4,7

(f) Recuperada de líquido de branqueamento, por precipitação ácida e aquecimento

(g) Cistina e tirosina considerados não-essenciais

(h) Somente metionina.

Tabela 10 - Coeficiente de Eficácia Alimentar - C.E.A, Coeficiente de Eficácia Protéica - C.E.P e Coeficiente de Digestibilidade-C.D da proteína recuperada de cefalotórax de camarão-rosa, em relação à caseína.

	Caseína	Proteína recuperada
Animais		
Peso inicial (g)	44,12 $\pm$ 2,14	40,82 $\pm$ 2,47
Peso final (g)	139,28 $\pm$ 14,35	95,95 $\pm$ 9,22
Peso ganho (g)	95,17 $\pm$ 14,73	54,73 $\pm$ 10,18
Consumo (g)		
Ração	279,43 $\pm$ 31,55	213,17 $\pm$ 19,80
Proteína	34,31 $\pm$ 3,87	24,13 $\pm$ 2,24
C.E.A (a)	0,34 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,02
C.E.P (a)	2,76 $\pm$ 0,14	2,25 $\pm$ 0,22
C.E.P corrigido (b)	2,50	2,04
Fezes (g)		
Total	14,48 $\pm$ 1,04	17,97 $\pm$ 1,31
Proteína (%)	22,87 $\pm$ 1,74	28,59 $\pm$ 0,84
Proteína total	3,30 $\pm$ 0,28	5,14 $\pm$ 0,40
C.D (%)	90,33 $\pm$ 0,49	78,69 $\pm$ 0,66

(a) Valores estatisticamente diferentes entre os grupos de animais ($P < 5\%$)

(b) C.E.P da caseína ajustado para 2,50⁽²¹⁾

veu o crescimento dos animais, pode-se afirmar que a mesma tem um valor nutricional inferior ao da caseína, parcialmente comprometido pela digestibilidade.

Todavia, quando os Coeficientes de Eficácia Protéica - C.E.P das proteínas, controle e experimental (Tabela 10), foram corrigidos em função dos respectivos Coeficientes de Digestibilidade - C.D, o mencionado valor nutricional passou de 81,5% para 93,8%, em relação ao apresentado pela caseína (Tabela 11).

Tabela 11 - Correção dos Coeficientes de Eficácia Protéica - C.E.P da caseína e da proteína recuperada de cefalotórax de camarão-rosa, em função dos respectivos Coeficientes de Digestibilidade - C.D.

	Proteína ingerida (g)	C.D (%)	Proteína absorvida (g)	Peso Ganho (g)	C.E.P	C.E.P corrigido
Caseína	34,31	90,33	30,99	95,17	2,76	3,07
Proteína recuperada	24,13	78,69	18,99	54,73	2,25	2,88

Os resultados pertinentes à qualidade da proteína de cefalotórax de camarão-rosa, nas formas de farinha integral⁽⁷⁸⁾, isolado protéico⁽⁷⁹⁾ e proteína recuperada (Tabela 10), comparados entre si, na Tabela 12, indicam, em todos os casos, que a digestibilidade prejudica parcialmente o aproveitamento biológico da mesma. A julgar pelos valores dos Coeficientes de Eficácia Protéica corrigidos, a proteína recuperada e estudada no presente trabalho tem um valor nutricional maior, em relação às demais.

TOMA e JAMES⁽⁸¹⁾ relatam, em estudo feito com a proteína presente em efluente líquido da industrialização de camarão, insolubilizada por precipitação isoelétrica, o mesmo valor nutricional exibido pela proteína recuperada de cefalotórax de camarão-rosa, com base no Coeficiente de Eficácia Protéica - C.E.P.

Tabela 12 - Coeficientes de Eficácia Alimentar - C.E.A, Coeficientes de Eficácia Protéica - C.E.P e Coeficientes de Digestibilidade - C.D da proteína de cefalotórax de camarão-rosa, em diferentes formas, e da caseína (entre parênteses).

	Proteína de cefalotórax de camarão-rosa		
	Farinha (78)	Isolado protéico (79)	Proteína recuperada
C.E.A.	0,223 (0,373)	0,269 (0,368)	0,25 (0,34)
C.E.P	2,200 (3,268)	2,345 (3,184)	2,25 (2,76)
C.E.P corrigido (a)	1,68 (2,50)	1,84 (2,50)	2,04 (2,50)
C.D (%)	78,71 (90,02)	71,88 (87,50)	78,69 (90,33)

(a) C.E.P da caseína ajustado para 2,50⁽²¹⁾

Dadas as características nutricionais apresentadas pela proteína recuperada a partir de cefalotórax de camarão-rosa, pode-se sugerir o seu emprego na alimentação humana ou animal, em associação com outras fontes protéicas. Considerando-se, por outro lado, o processo usado em sua recuperação, o ideal seria complementar toxicologicamente o presente estudo⁽²¹⁾, embora pareça, à pri-

meira vista, que o mesmo não confira ao produto obtido qualidades que venham a contrariar o uso indicado.

4.3 - Caracterização toxicológica do produto protéico recuperado

De acordo com os objetivos de trabalho, o produto protéico recuperado foi avaliado toxicologicamente através da quantificação dos níveis de certos metais tóxicos. Para a inclusão deste estudo no planejamento adotado, levou-se em conta o fato de a matéria-prima ser de origem marinha e estar na forma seca e desengordurada (concentrada), principalmente, passível portanto de estar perigosamente contaminada, como por exemplo pelo mercúrio.

De acordo com os resultados obtidos, os níveis detectados de mercúrio, cádmio, chumbo, cobre e zinco no produto derivado de cefalotórax de camarão-rosa estão bem abaixo das quantidades máximas permitidas dos mesmos em alimentos (Tabela 13).

O fato de as quantidades encontradas desses metais serem de 41 a 206 vezes menores que os limites de tolerância indicados (Tabela 13), mostra ampla possibilidade de uso do produto em pauta na alimentação, sem qualquer restrição sob o ponto de vista analisado. Esta margem de segurança fica ainda muito maior, quando se considera que o material protéico recuperado de cefalotórax de camarão-rosa participaria na dieta como produto de suplementação.

Tabela 13 - Teor de metais tóxicos no produto protéico recuperado de cefalotórax de camarão-rosa, desengordurado com éter etílico, e os limites máximos dos mesmos permitidos em alimentos.

Metais tóxicos	Produto protéico (ppm)	Limites máximos de tolerância (ppm)
Mercúrio	0,012	0,5 (a)
Cádmio	0,008	1,0 (b)
Chumbo	0,100	8,0 (b)
Cobre	0,500	30,0 (b)
Zinco	0,242	50,0 (b)

(a) Para peixes, crustáceos e moluscos⁽¹³⁾

(b) Para outros alimentos⁽¹²⁾

4.4 - Caracterização tecnológica da proteína recuperada

Três são as características básicas esperadas ou desejadas de uma nova fonte de proteína, como a estudada no presente trabalho, para que a mesma tenha completa utilização na alimentação humana, ou seja, ter alto valor nutricional, ser inerte sob o ponto de vista toxicológico e possuir propriedades funcionais que possibilitem sua aplicação também como componente alimentar de interesse tecnológico.

Enquanto a qualidade nutricional da proteína está subordinada à disponibilidade e ao aproveitamento dos aminoácidos essenciais, o valor tecnológico depende de propriedades como a solubilidade em água e em soluções salinas, a habilidade em emulsionar lí-

pides, capacidade em formar espuma e gel, entre outras.

A caracterização tecnológica da proteína recuperada de cefalotórax de camarão-rosa foi executada através da solubilidade, dispersibilidade, capacidade de emulsificação, estabilidade da emulsão formada, absorção de água e absorção de óleo.

Em geral, os concentrados protéicos de pescado possuem alto valor nutricional, são atóxicos e não apresentam boas propriedades funcionais em virtude das condições de processamento sofridas, como, por exemplo, o tratamento a quente com solventes orgânicos, destinados à desidratação, desengorduramento e desodorização. Durante o processamento ocorrem a denaturação da proteína nativa, a interação de vários grupos funcionais reativos, etc, resultando na perda de propriedades de interesse para a tecnologia de alimentos, entre as quais a afinidade pela água. Consequentemente, o emprego desses concentrados fica limitado unicamente à condição de suplemento protéico (16,18,36,52,58,66).

É em razão deste aspecto que muitos pesquisadores têm procurado métodos adequados visando a melhoria do valor tecnológico desses produtos, a fim de aumentar-lhes o potencial de emprego (16,36,52,66).

4.4.1 - Solubilidade

Muitas das importantes propriedades funcionais de proteínas estão relacionadas com as interações água-proteína e, dentre elas, evidentemente a solubilidade. As características de solubilidade, em variadas condições, são empregadas na otimiza-

ção de extração de proteínas de diferentes fontes e fornece ainda um bom índice do potencial de aplicação. A solubilidade de uma proteína em estudo, sob diferentes valores de pH, é frequentemente a primeira propriedade funcional a ser determinada⁽³⁶⁾.

Para melhoria na solubilidade da proteína denaturada tem sido apontado o uso da hidrólise parcial, química ou enzimática, enquanto o ajuste do pH, entre 7 e 8, antes da secagem, é um artifício indicado para proteínas vegetais. Para o concentrado protéico de pescado, considerado o exemplo primeiro de proteína cujas propriedades funcionais foram sacrificadas no processamento, entre os métodos colocados em prática consta a hidrólise alcalina^(36,76).

A solubilidade da proteína de cefalotórax de camarão, obtida sob diferentes condições, foi testada em função da variação dos valores de pH entre 2 a 12. Os resultados indicam que a mesma mostra uma solubilidade típica, ou seja, é tanto mais solúvel quanto mais o valor do pH se afasta da região isoelétrica, sendo praticamente completa a pH 12, independente do método de preparação (Tabela 14 e Figura 3).

A proteína precipitada isoeletricamente com auxílio de aquecimento, (a) dessecada a 45°C e desengordurada com éter (amostra I), (b) não dessecada e nem desengordurada (amostra III), (c) desengordurada com etanol e dessecada a temperatura ambiente (amostra IV), (d) desengordurada com etanol e ajustada a pH 8,5 antes da dessecação a temperatura ambiente (amostra V) e a isolada por solubilização com álcali, precipitada a pH 4,5, dessecada a 45°C e desengordurada com éter (amostra II), incluída no ensaio com finalidades comparativas, apresentaram uma solubilidade de 20% no máximo, na faixa de pH entre 4 e 7, o que é relativamente muito baixa (Tabela 14 e Figura 3).

Tabela 14 - Solubilidade da proteína de cefalotórax de camarão-rosa, obtida por diferentes maneiras, em função do pH (em percentagem de proteína solubilizada e em mg de proteína solubilizada / 100 ml, entre parênteses).

pH	Proteína de cefalotórax de camarão-rosa						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
2,0	5,00 (18,00)	12,75 (45,92)	9,50 (34,20)	15,00 (54,00)	20,50 (73,80)	51,00 (183,61)	79,87 (287,53)
3,0	2,50 (9,00)	3,98 (14,34)	2,50 (9,00)	2,50 (9,02)	7,46 (26,87)	25,34 (91,22)	48,43 (174,36)
4,0	1,69 (6,10)	3,17 (11,41)	1,47 (5,31)	1,50 (5,40)	5,63 (20,27)	21,77 (78,36)	34,97 (125,89)
5,0	2,21 (7,96)	3,54 (12,74)	2,65 (9,55)	2,00 (7,20)	9,00 (32,40)	27,18 (97,86)	49,84 (179,42)
6,0	2,88 (10,36)	6,50 (23,40)	5,50 (19,80)	3,54 (12,73)	12,85 (46,25)	34,56 (124,42)	83,32 (299,95)
7,0	(6,56) (23,63)	14,55 (52,38)	15,50 (55,80)	8,70 (31,31)	21,33 (76,79)	40,10 (144,38)	90,50 (325,80)
8,0	20,06 (72,22)	27,50 (99,00)	50,51 (181,84)	40,52 (145,87)	44,15 (158,94)	55,26 (198,94)	92,09 (331,52)
9,0	42,52 (153,07)	50,50 (181,80)	95,00 (342,00)	80,50 (289,80)	76,21 (274,36)	78,56 (282,82)	93,14 (335,30)
10,0	65,10 (234,36)	65,52 (235,87)	96,00 (345,60)	88,26 (317,74)	84,11 (302,80)	90,03 (324,11)	95,00 (342,00)
11,0	84,00 (302,40)	85,06 (306,22)	96,52 (347,47)	92,50 (333,00)	90,06 (324,22)	94,00 (338,40)	96,00 (345,60)
12,0	97,05 (349,38)	95,01 (342,04)	97,08 (349,49)	94,53 (340,31)	95,13 (342,47)	95,05 (342,18)	97,50 (351,00)

- I - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, dessecada a 45°C e desengordurada com éter.
- II - Solubilizada em álcali, precipitada a pH 4,5, dessecada a 45°C e desengordurada com éter.
- III - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, mas não dessecada e nem desengordurada.
- IV - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, desengordurada com etanol e dessecada a temperatura ambiente.
- V - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, desengordurada com etanol, ajustada a pH 8,5 e dessecada a temperatura ambiente.
- VI - Precipitada a pH 4,5, desengordurada com etanol, ajustada a pH 8,5 e dessecada a temperatura ambiente.
- VII - Amostra IV solubilizada a pH 12, a temperatura ambiente, e imediatamente ajustada a pH desejado.

Figura 3 - Solubilidade da proteína do cefalotórax de camarão-rosa, obtida por diferentes maneiras, em função do pH.

- I - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, dessecada a 45°C e desengordurada com éter.
 II - Solubilizada em álcali, precipitada a pH 4,5, dessecada a 45°C e desengordurada com éter.
 III - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, mas não dessecada e nem desengordurada.
 IV - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, desengordurada com etanol e dessecada a temperatura ambiente.
 V - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, desengordurada com etanol, ajustada a pH 8,5 e dessecada a temperatura ambiente.
 VI - Precipitada a pH 4,5, desengordurada com etanol, ajustada a pH 8,5 e dessecada a temperatura ambiente.
 VII - Amostra IV solubilizada a pH 12, a temperatura ambiente, e imediatamente ajustada a pH desejado.

A solubilidade passou a ser melhor, isto é, de 40%, a pH 7, quando a proteína ensaiada foi recuperada unicamente por precipitação a pH 4,5, sem o aquecimento empregado em casos anteriores, desengordurada com etanol e ajustada a pH 8,5 antes da dessecação a temperatura ambiente (amostra VI). É oportuno mencionar que a proteína recuperada nestas condições tem um rendimento menor (Tabela 4).

Quando a proteína recuperada por precipitação a pH 4,5 e aquecimento a 70-75°C, desengordurada com etanol e dessecada (amostra IV) foi dissolvida a pH 12, a temperatura ambiente, e imediatamente ajustada aos níveis desejados de pH (amostra VII), pôde ser evidenciado que a pH 4 sua solubilidade ficou mantida em 35% e, a pH 7, em 90%. Obviamente, este fato foi possível à custa da hidrólise parcial ocorrida e que provocou a formação de polipeptídeos solúveis.

Com a solubilização a pH 12 e posterior insolubilização a pH 4, impostas à amostra IV (Tabela 14 e Figura 3), 35% da proteína manteve-se em solução e 65% na forma insolubilizada (amostra VII), significando que 64% da proteína anteriormente dissolvida, a pH 12, reteve sua capacidade de precipitação isoelétrica (pH 4). Este fato revela a retenção da funcionalidade da proteína e tem importância sob o ponto de vista de sua aplicação⁽⁷⁶⁾.

Outros aspectos relacionados à funcionalidade desta proteína foram também observados. Após dissolvê-la, ajustá-la a pH 7 e submetê-la à aquecimento de 98°C/30 min, em banho-maria, ou à ação do ácido tricloroacético a 20% (1:1), respectivamente, provocou-se uma precipitação protéica de 31,5% e 51,3%.

Os resultados obtidos mostram, em termos gerais, uma

concordância com as informações de que concentrados protéicos de pescado exibem baixa solubilidade, em decorrência das condições de processamento^(36,66).

No que diz respeito ao tratamento empregado, DUBROW e cols.⁽¹⁸⁾, por exemplo, evidenciaram o efeito da temperatura de extração com isopropanol sobre a remoção de lípidos e algumas propriedades funcionais, mostrando que a solubilidade da proteína do concentrado de pescado, em NaCl a 5% e a pH 7,5, diminuiu com aumento da mesma, ou seja, foi de 27% a 20°C, 19% a 40°C e 8% a 50°C. No pH considerado, as amostras I, III, IV e V da proteína de camarão apresentaram uma solubilidade de 10 a 35% e, no caso da amostra VI, aproximadamente de 47% (Figura 3).

WARRIER e NINJOOR⁽⁸⁴⁾ encontraram uma solubilidade de 3% em água a temperatura ambiente, de 10% quando esta última foi aquecida a 60°C e de 15% em NaCl a 5%, para um concentrado protéico de pescado obtido pela combinação de irradiação e aquecimento. Quando esse concentrado foi dissolvido a pH 12,8, com NaOH 0,2 N, a temperatura ambiente, e posteriormente ajustado a pH 4 e a pH 7, sua solubilidade ficou mantida em aproximadamente 30% e 80%, respectivamente. Em condições semelhantes, a solubilidade da proteína de cefalotórax de camarão foi de 35% e 90%, respectivamente a pH 4 e a pH 7 (amostra VII; Tabela 14 e Figura 3).

MILLER e GRONINGER Jr⁽⁵²⁾, estudando a proteína miofibrilar de pescado, modificada por acilação e hidrólise com bromelina, apontaram uma solubilidade em NaCl 0,2 M, a pH 7, de 42 a 50% quando acetilada e de 20 a 25% quando succinilada.

RASEKH e METZ⁽⁵⁸⁾ prepararam um isolado protéico de pescado através da solubilização alcalina com NaOH 0,12 N, a pH 12,5,

a $70 \pm 5^{\circ}\text{C}/2 \text{ h}$, branqueamento com H_2O_2 a 3%, a pH 11,5, a $50 \pm 5^{\circ}\text{C}/30 \text{ min}$, precipitação isoelétrica da proteína (pH 4,5) e três extrações sucessivas com isopropanol, a $60 \pm 5^{\circ}\text{C}/15 \text{ min}$. Mesmo empregando as condições mencionadas, sabidamente propícias à redução da funcionalidade protéica, esses autores relataram para o referido produto uma solubilidade, a pH 7, de 43,5% em NaCl a 5% e de 47,8% em água, a qual é ligeiramente superior à obtida para a amostra VI da proteína recuperada de cefalotórax de camarão-rosa (40%; Tabela 14 e Figura 3).

Como foi visto, na Tabela 14 e Figura 3, a proteína de camarão, através das amostras I, III, IV e V, mostrou baixa solubilidade a pH 7. Quando obtida sem aquecimento e modificada com álcali (amostra VI) exibiu uma solubilidade, a pH 7, de, no mínimo, mais de 100%, em relação às demais, sem contudo ser muito alta (40%). Por outro lado, a amostra IV, que era pouco solúvel - (8,7%, a pH 7) exibiu imediata, fácil e quase completa dissolução a pH 12 (97,5%), a temperatura ambiente, e reteve 90% da solubilidade quando neutralizada a pH 7 (amostra VII).

Esses resultados mostram que é possível, conforme a literatura^(36,66), conferir uma maior solubilidade à proteína recuperada de camarão, através da adequação de tratamentos empregados e/ou por modificação alcalina.

O emprego de álcali na industrialização de alimentos atende à variados objetivos. O tratamento alcalino sobre proteínas alimentares, em condições consideradas drásticas, pode levar ao aparecimento de uma série de manifestações indesejáveis, como a alteração da estrutura química e diminuição do valor nutricional, podendo ainda conferir propriedades tóxicas ao produto^(15,36,48,66,85).

WHITAKER⁽⁸⁵⁾ observa que quando o contato entre o alimento e o álcali é mantido ao mínimo, numa temperatura tão baixa quanto possível, além de outros cuidados, não há aparentemente razões para abandonar o tratamento alcalino empregado na industrialização de alimentos. CHEFTEL⁽¹⁵⁾, por sua vez, considera aceitável um tratamento alcalino não drástico sobre uma proteína, desde que o processo permaneça sob cuidadoso controle.

É sob este ângulo que visualiza-se a possibilidade de melhoria nas propriedades funcionais de concentrados protéicos, do tipo estudado neste trabalho, de tal forma que as modificações impostas através do tratamento usado não venham a comprometer o produto final, em termos nutricionais ou toxicológicos.

4.4.2 - Dispersibilidade

A dispersibilidade observada significa a quantidade de proteína de cefalotórax de camarão-rosa que se manteve dispersa em solução, após a homogeneização e um período de repouso.

A dispersibilidade, ao lado da solubilidade e da capacidade de absorção de água, além de outras, enquadra-se numa mesma classe geral de propriedades funcionais de proteínas (hidratação), as quais são de interesse tecnológico⁽³⁶⁾.

Os resultados mostram que a proteína de cefalotórax de camarão-rosa dispersada corresponde praticamente àquela que se solubilizou (Tabela 15).

De certa forma, DUBROW e cols.⁽¹⁸⁾ observaram o mesmo fenômeno para um concentrado protéico de pescado extraído com isopropanol, a diferentes temperaturas. Os autores encontraram uma correlação direta ($r = 0,81$) entre a proteína solu-

Tabela 15 - Solubilidade e dispersibilidade da proteína de cefalotórax de camarão-rosa, obtida por diferentes maneiras, a pH 7.

Proteína	Solubilidade ^(a) (%)	Dispersibilidade (%)
I	6,56	6,95 ± 0,46
III	15,50	17,30 ± 0,23
IV	8,70	9,09 ± 0,32
V	21,33	22,68 ± 0,49
VI	40,10	45,50 ± 0,65

(a) Tabela 14

- I - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, dessecada a 45°C e desengordurada com éter.
- III - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, mas não dessecada e nem desengordurada.
- IV - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, desengordurada com etanol e dessecada a temperatura ambiente.
- V - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, desengordurada com etanol, ajustada a pH 8,5 e dessecada a temperatura ambiente.
- VI - Precipitada a pH 4,5, desengordurada com etanol, ajustada a pH 8,5 e dessecada a temperatura ambiente.

vel em NaCl a 5%, pH 7,5, e os sólidos suspensos em água. Os níveis destes últimos atingiram 26%, 16% e 9%, respectivamente para os concentrados obtidos nas temperaturas de 20°C, 40°C e 50°C.

RASEKC e METZ⁽⁵⁸⁾ visualizaram fato semelhante com um isolado protéico preparado com peixe descabeçado e eviscerado, o qual apresentou uma dispersibilidade e uma solubilidade de 43,5%, em NaCl a 5%, a pH 7. No entanto, com outros isolados obtidos de peixe integral ou descabeçado e eviscerado, a dispersibilidade em água ou em NaCl a 5%, a pH 7, sempre foi maior que a solubilidade (73 a 158%).

4.4.3 - Capacidade de emulsificação e estabilidade da emulsão

A avaliação da capacidade de emulsificação tem posição de destaque em estudos sobre as propriedades funcionais de proteínas, visto que a mesma é importante no processamento de embutidos de carne (salsicha, salame, etc), no preparo de maionese, pães, etc.

A capacidade de emulsificação da proteína recuperada de cefalotórax de camarão-rosa foi avaliada através de emulsão do tipo "óleo em água", em sistema modelo definido, cujos resultados constam na Tabela 16.

Tabela 16 - Solubilidade, capacidade de emulsificação e estabilidade da emulsão da proteína recuperada de cefalotórax de camarão-rosa e da proteína comercial de soja (Proteimax 90 HG), a pH 7.

Proteína	Solubilidade (a) (%)	Capacidade de emulsificação (ml de óleo/100mg de proteína)	Estabilidade da emulsão (% de óleo não liberado)
IV	8,70	nula	—
V	21,33	25,5 ± 2,9	95,30 ± 1,30
VI	40,10	38,6 ± 3,2	94,90 ± 2,50
VII	90,50	100,9 ± 2,2	97,60 ± 1,65
Proteimax 90 HG (b)	—	80,4 ± 3,0	96,50 ± 2,00

(a) Tabela 14

(b) SANBRA S.A.

IV - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, desengordurada com etanol e dessecada a temperatura ambiente.

V - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, desengordurada com etanol, ajustada a pH 8,5 e dessecada a temperatura ambiente.

VI - Precipitada a pH 4,5, desengordurada com etanol, ajustada a pH 8,5 e dessecada a temperatura ambiente.

VII - Amostra IV solubilizada a pH 12, a temperatura ambiente, e imediatamente ajustada ao pH desejado.

Está demonstrado, na citada tabela, que amostras da referida proteína com melhor solubilidade apresentaram maior capacidade de emulsificação. A relação existente entre a solubilidade e a habilidade de emulsificação de uma proteína é apontada na literatura^(36,66), embora seja mencionado também que um concentrado protéico de pescado insolúvel, mas com capacidade de re-hidratação, é capaz de estabilizar emulsões do tipo "óleo em água"⁽¹⁶⁾.

De acordo com a Tabela 16, a proteína recuperada nas condições preconizadas no presente trabalho, como é a rigor o caso da amostra IV, apresentou uma atividade emulsionante nula, confirmando-se as informações da literatura^(36,66), influenciada pela baixa solubilidade (8,70%, a pH 7) ao que tudo indica. Com a modificação protéica por álcali e alteração do processo de recuperação da mesma, a proteína de camarão passou a apresentar atividades emulsificantes.

A amostra V, com uma solubilidade de 21%, emulsionou 25,5 ml de óleo/100mg de proteína, ao passo que a VI, com o dobro de solubilidade (40%), emulsificou 38,6 ml do lípide. Por outro lado, a amostra VII, que na verdade é a amostra IV, destituída de atividade emulsionante e com baixa solubilidade a pH 7, dissolvida a pH 12 e neutralizada a pH 7, emulsionou 20% a mais de óleo (100,9 ml) do que a Proteimax 90 HG (80,4 ml), que é uma proteína de soja comercial indicada como surfactante e ligante, para produtos cárneos industrializados, e incluída no experimento para fins comparativos.

Pode ainda ser evidenciado, na Tabela 16, que é bastante sugestivo o comportamento da amostra VI, pois apresentou uma capacidade de emulsificação de 48% em relação à da Proteimax 90 HG e de 38% se comparada à amostra VII.

SIKORSKI e NACZK⁽⁶⁶⁾ apresentaram alguns padrões de qualidade para concentrados protéicos apropriados para o emprego na indústria de alimento. Apontaram, no caso da capacidade de emulsificação, um valor de 200 ml de óleo/100mg de proteína, o qual supera bastante os resultados da Tabela 16.

A estabilidade das emulsões formadas com as proteínas estudadas pode ser considerada boa, pois nas condições do método empregado para avaliá-la, 95 a 98% do óleo manteve-se emulsionado (Tabela 16).

Em geral, as técnicas de avaliação das propriedades emulsionantes de uma proteína, como também de outras propriedades funcionais, são empíricas e não obedecem, a rigor, a uma necessária padronização, o que torna bastante crítico o uso dos dados da literatura⁽³⁶⁾.

Na literatura pertinente, vários trabalhos dão informações quanto ao valor tecnológico da proteína de concentrados de pescado. Como já foi dito, esses produtos, via de regra, apresentam uma habilidade emulsionante nula e baixa solubilidade, a menos que sejam modificados^(36,66).

Um exemplo disso é o estudo feito por RASEKH e METZ⁽⁵⁸⁾, onde um isolado protéico, obtido por solubilização alcalina e precipitação isoelétrica, exibiu boas propriedades funcionais. Os autores apontaram uma capacidade de emulsificação de 51,2 ml de óleo/458mg de proteína ou de 48 ml de óleo/469mg de proteína, a pH 7, respectivamente para o produto elaborado a partir de peixe inteiro ou de peixe descabeçado e eviscerado, afirmando ainda que o isolado obtido poderia ser empregado em emulsões cárneas.

Por outro lado, COBB III e HYDER⁽¹⁶⁾ relataram uma capaci

dade de emulsificação de 95 ml de óleo/870mg de proteína, a pH 7, para um concentrado protéico de pescado insolúvel, mas com habilidade de re-hidratação, em cuja preparação constou um tratamento com ácido a pH 2,5 e NaCl a 5%, antes da extração a quente com hexana e etanol.

Para a proteína miofibrilar de pescado, modificada por acilação, MILLER e GRONINGER Jr.⁽⁵²⁾ apontaram valores de capacidade de emulsificação de 75g de óleo/100mg de proteína acetilada e de 125g de óleo/100mg de proteína succinilada.

KORSCHGEN e BALDWIN⁽⁴⁰⁾ avaliaram as características de uma emulsão do tipo maionese, empregando na sua preparação um concentrado protéico de pescado previamente solubilizado a pH 12, com NaOH, a $95 \pm 3^{\circ}\text{C}$ /20 minutos, e ajustado a pH 4, 6 e 8. Ficou demonstrado que a habilidade do concentrado protéico (20 g do produto solubilizado a 10%, a pH 6 ou 8) em estabilizar a emulsão era equivalente a do ovo integral.

Os resultados obtidos indicam que é possível chegar-se a uma proteína derivada de resíduo de camarão-rosa dotada de capacidade de emulsificar óleo, através da modificação química. A exemplo do que foi considerado para a solubilidade, o emprego de álcali é uma tentativa válida nesse sentido, desde que não ofereça os riscos mencionados.

4.4.4 - Absorção de água e absorção de óleo

Na Tabela 17 foram colocados os resultados referentes à capacidade da proteína de cefalotórax de camarão em absorver água e óleo.

Tabela 17 - Solubilidade, capacidade de absorção de água e capacidade de absorção de óleo da proteína recuperada de cefalotórax de camarão-rosa.

Proteína	Solubilidade (a) (%)	Absorção de água (ml de água/g de proteína)	Absorção de óleo (ml de óleo/g de proteína)
IV	8,70	2,11 $\pm$ 0,15	1,37 $\pm$ 0,12
V	21,33	4,31 $\pm$ 0,08	1,41 $\pm$ 0,05
VI	40,10	2,71 $\pm$ 0,11	1,35 $\pm$ 0,10

(a) Tabela 14; a pH 7.

IV - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, desengordurada com etanol e dessecada a temperatura ambiente.

V - Precipitada a pH 4,5/70-75°C, desengordurada com etanol, ajustada a pH 8,5 e dessecada a temperatura ambiente.

VI - Precipitada a pH 4,5, desengordurada com etanol, ajustada a pH 8,5 e dessecada a temperatura ambiente.

Verifica-se, nesta tabela, que a amostra V tem uma capacidade de absorver água duas vezes e uma vez e meia a mais que as amostras IV e VI, respectivamente. Considerando-se o tratamento imposto à proteína, pode-se afirmar que o ajuste do pH a 8,5, antes da secagem a temperatura ambiente, é o responsável pela maior habilidade em absorver água da amostra V, em relação à IV.

Na referida tabela, ainda é observado que a amostra de proteína mais solúvel não foi exatamente aquela que exibiu maior habilidade em absorver água.

A habilidade de hidratação de uma proteína é importante no processamento de pães e produtos cárneos, por prevenir a perda d'água⁽³⁶⁾.

Pela informação de SIKORSKI e NACZK⁽⁶⁶⁾, um concentrado protéico de pescado embebe-se, a pH neutro, somente de 3g de água/

/grama de proteína, com o que, de certa forma, concordam os resultados da Tabela 17.

Dentro dos padrões de qualidade, apontados pelos referidos autores, para concentrados protéicos de pescado passíveis de aplicações industriais, consta um valor de 6 a 10g de água/g de proteína para a capacidade de absorção de água, faixa não atingida pela proteína recuperada de cefalotórax de camarão-rosa (Tabela 17).

COBB III e HYDER⁽¹⁶⁾ obtiveram um concentrado protéico dotado da habilidade de re-hidratação, tratando o músculo do peixe com ácido, a pH 2,5, em presença de NaCl, antes da extração a quente com hexana e etanol. O citado produto absorveu 7 ml de água/g de proteína, quando em meio de NaCl 0,133 M, a pH 7, ou de 11 a 13 ml de água/g de proteína, em pH 5 e na presença de 0,3 a 1,2 M de NaCl.

WARRIER e NINJOOR⁽⁸⁴⁾ relataram que um concentrado protéico, obtido por processo envolvendo irradiação e aquecimento, absorveu 7g de água/g de proteína. Valores surpreendentes foram descritos por MILLER e GRONINGER Jr⁽⁵²⁾, para a proteína miofibrilar de pescado modificada por acilação, isto é, de 25 ml de água/g de proteína acetilada e de 50 ml de água/g de proteína succinilada.

A absorção de óleo pelas amostras de proteína de cefalotórax de camarão basicamente foi a mesma, ou seja, de 1,3 a 1,4 ml de óleo/g de proteína, independente dos modos de obtenção da mesma (Tabela 17).

O mecanismo de absorção de óleo, nos moldes como foi determinado, é atribuído principalmente a um aprisionamento físico do mesmo⁽⁸³⁾. A habilidade da proteína em ligar-se a lípidos é muito importante em certas preparações tecnológicas, principalmente porque melhora a retenção do "flavor"⁽³⁶⁾.

Consta registrado na literatura, que proteínas ou prepara

ções protéicas de origem vegetal absorvem distintas quantidades de óleo por grama de proteína, tais como, 0,84 ml para a farinha de trigo, de 0,84 a 1,54 ml no caso da soja, de 2,07 a 2,56 ml para o girassol⁽⁴³⁾ e de 1,75 a 4,30ml para a alfafa⁽⁸³⁾. Por esses dados, o produto protéico recuperado de cefalotórax de camarão-rosa assemelha-se à farinha de trigo e à soja, quanto à habilidade em absorver óleo.

4.5 - Caracterização do resíduo sólido gerado na recuperação de proteína

O resíduo sólido resultante no processo de recuperação de proteína de cefalotórax de camarão-rosa, preconizado no presente trabalho, foi caracterizado em termos químico-nutricional e como fonte de quitina e quitosana. Para tanto, determinaram-se a composição química básica, os aminoácidos essenciais, o cálculo químico correspondente, em relação à caseína⁽²⁴⁾ e à proteína-padrão da F.A.O./O.M.S.⁽²⁰⁾, e finalmente o rendimento em quitina e quitosana.

O resíduo em pauta basicamente é constituído de exoesqueleto. Assim, a proteína, quitina e cálcio, os três componentes principais deste último, poderão estar presentes em níveis apreciáveis, tornando o referido resíduo potencialmente interessante a propósitos alimentares e não-alimentares.

A Tabela 18, onde constam reunidos os resultados referentes ao processo de recuperação protéica, indica que partindo-se de 100g de cefalotórax são geradas 9,38g do resíduo, paralelamente a 2,19g de proteína.

A composição química deste resíduo evidencia, na verdade, que são altos os níveis de CaCO_3 (41%) e quitina (31%), conforme era esperado, enquanto o teor protéico atingiu 19% (Tabela 19).

Tabela 18 - Sólidos, proteína e resíduo obtidos no processo de recuperação protéica de cefalotórax de camarão-rosa, em g/100g de amostra fresca.

Resultados	Sólidos recuperados	Proteína recuperada	Resíduo resultante	Sólidos / resíduo
Mínimo	3,70	2,08	8,60	1:2,07
Máximo	4,00	2,32	10,20	1:2,76
Médio	3,91	2,19	9,38	1:2,38
D.P	$\pm 0,12$	$\pm 0,08$	$\pm 0,47$	$\pm 0,18$

Tabela 19 - Composição química do resíduo sólido resultante da recuperação de proteína de cefalotórax de camarão-rosa, em g/100g de amostra.

Componentes	Resíduo
Umidade	5,77 $\pm$ 0,18
Cinza corrigida	42,46
Cinza	36,48 $\pm$ 0,12
Cinza sulfatada	57,76 $\pm$ 0,30
Cálcio	16,35 $\pm$ 0,31
CaCO ₃	40,83
Sílica	0,26 $\pm$ 0,08
Proteína corrigida	19,02
Proteína	32,57 $\pm$ 0,24
Proteína aparente	13,55
Quitina	31,48 $\pm$ 0,29
Extrato etéreo	1,20 $\pm$ 0,05

A proteína do citado produto exibe quantidades de aminoácidos essenciais mais baixas do que as reveladas pela caseína⁽²⁴⁾, despontando o triptofano e lisina como as mais acentuadas, o que também ocorre em relação à proteína da F.A.O/O.M.S.⁽²⁰⁾, porém em menor intensidade (Tabela 20).

Com base no cálculo químico, o valor nutricional desta proteína é muito baixo, ou seja, de 21% em relação à caseína⁽²⁴⁾ e de 35% considerando-se a proteína da F.A.O/O.M.S.⁽²⁰⁾, comprometido pelo triptofano como primeiro aminoácido limitante (Tabela 20).

Tabela 20 - Aminoácidos essenciais do resíduo sólido resultante da recuperação protéica de cefalotórax de camarão-rosa e o cálculo químico correspondente, em relação à caseína⁽²⁴⁾ e à proteína-padrão da F.A.O/O.M.S.⁽²⁰⁾.

Aminoácidos essenciais	Resíduo	Caseína		F.A.O/O.M.S	
	g/100g pro teína	g/100g pro teína	Cálculo químico	g/100g pro teína	Cálculo químico
Isoleucina	3,15	5,52	57	4,00	79
Leucina	4,61	9,71	47	7,00	66
Lisina	2,33	8,29	28	5,50	42
Metionina + cistina (a)	1,66	3,22	51	3,50	47
Fenilalanina + tirosina (a)	8,67	11,28	77	6,00	144
Treonina	3,88	4,75	82	4,00	97
Triptofano	0,35	1,65	21	1,00	35
Valina	4,50	6,88	65	5,00	90

(a) Cistina e tirosina considerados não-essenciais.

A proteína em pauta foi comparada, na Tabela 21, com a recuperada de cefalotórax de camarão-rosa e com a integrante da

carapaça (exoesqueleto correspondente ao cefalotórax) do camarão Penaeus japonicus.

Tabela 21 - Aminoácidos essenciais da proteína recuperada de cefalotórax de camarão-rosa (a), do resíduo sólido resultante da recuperação desta última, da carapaça de camarão (b), em g/100g de proteína, e o cálculo químico correspondente (entre parênteses), em relação à proteína-padrão da F.A.O./O.M.S (20).

Aminoácidos essenciais	Proteína recuperada (a)	Resíduo resultante	Carapaça (b)	F.A.O./O.M.S
Isoleucina	5,55 (139)	3,15 (79)	2,20 (55)	4,00
Leucina	7,61 (109)	4,61 (66)	2,20 (31)	7,00
Lisina	5,77 (105)	2,33 (42)	2,00 (36)	5,50
Metionina	2,80	1,51	0,10	
Cistina (c)	1,67	0,15	(d)	
Metionina + cistina (c)	4,47 (128)	1,66 (47)	0,10 (e) (3)	3,50
Fenilalanina + tirosina (c)	11,59 (193)	8,67 (144)	3,00 (50)	6,00
Treonina	4,66 (116)	3,88 (97)	1,90 (47)	4,00
Triptofano	0,90 (90)	0,35 (35)	(d)	1,00
Valina	5,96 (119)	4,50 (90)	8,70 (174)	5,00

(a) Tabela 8

(b) Penaeus japonicus⁽⁶³⁾

(c) Cistina e tirosina considerados não-essenciais

(d) Não quantificados por estarem em baixos teores

(e) Somente metionina

Nesta tabela, evidencia-se que a proteína do resíduo é marcadamente inferior à recuperada de cefalotórax, principalmente devido aos baixos níveis registrados para a lisina, metionina + cistina e triptofano.

Através do cálculo químico dos aminoácidos essenciais, nota-se que enquanto esta última tem uma qualidade nutricional de 90%, em relação à proteína da F.A.O./O.M.S.⁽²⁰⁾, limitada unicamente pelo triptofano, a do resíduo é de 35%, com limitação primária também em triptofano, secundária em lisina e terciária em metionina + cistina.

Comparando-se a proteína do resíduo e da carapaça do camarão Penaeus japonicus verifica-se, a não ser pelos baixos e praticamente idênticos níveis de lisina, cistina e triptofano, que ambos têm em comum, que não consumou-se a possibilidade de as mesmas serem estritamente semelhantes, como poderia ocorrer (Tabela-21).

Considerando-se agora o produto residual, que resultou da recuperação protéica do cefalotórax, como matéria-prima de interesse não-alimentar, pode ser visto que a partir do equivalente a 100g de cefalotórax é possível obter 2,73g de quitina ou 2,48g de quitosana ou, de outra forma, 29,11g de quitina ou 26,42g de quitosana/100g do referido resíduo (Tabela 22).

Em decorrência da alta quantidade de CaCO_3 (41%) e quitina (31%) (Tabela 19), dos baixos teores de certos aminoácidos, como o triptofano e lisina, e do reduzido valor nutricional (21% e 35%), estimado com base na caseína⁽²⁴⁾ e na proteína da F.A.O./O.M.S.⁽²⁰⁾ (Tabela 20), ao resíduo em apreço não é sugerido o emprego na alimentação animal, como fonte protéica.

Tabela 22 - Rendimento em quitina e quitosana, a partir do resíduo sólido resultante da recuperação protéica de cefalotórax de camarão-rosa.

	Rendimento		Recuperação ^(b) (%)
	g/100g amostra fresca (a)	g/100g resíduo	
Quitina	2,73	29,11 $\pm$ 0,75	92,47
Quitosana	2,48	26,42 $\pm$ 0,60	—

(a) Calculado com base em 9,38g de resíduo/100g de amostra fresca (Tabela 18)

(b) Em relação a 31,48g de quitina/100g de resíduo (Tabela 19)

Parece viável destiná-lo como matéria-prima visando a obtenção de quitina, quitosana ou outros derivados, substâncias que atualmente, conforme abordado, detêm grande potencialidade de uso nos mais variados setores.

Mencionou-se anteriormente que no processo de obtenção da quitina, a partir de resíduos de crustáceos, tal como consta ilustrado na Figura 1, é procedida a remoção da proteína com álcali diluído, destinando-a à alimentação animal. No caso do resíduo em pauta, entretanto, a recuperação protéica para os fins apontados é dispensável, em virtude da baixa significação nutricional de sua proteína, segundo o que consta na Tabela 20.

5 - CONCLUSÕES

- 5.1 - Com o método preconizado neste trabalho, pôde ser recuperada principalmente proteína muscular e visceral presente em cefalotórax de camarão-rosa, com rendimento de cerca de 2%, acompanhada de baixos teores em cálcio (0,03%) e quitina (0,5%).
- 5.2 - Com base no cálculo químico, a proteína recuperada apresentou uma qualidade nutricional de 54% e de 90%, comparada à caseína e à proteína-padrão da F.A.O./O.M.S, respectivamente, sendo limitada primariamente pelo triptofano.
- 5.3 - A eficiência da proteína recuperada, em promover o crescimento dos animais, foi de 81% em relação à da caseína, parcialmente prejudicada pela sua digestibilidade relativamente baixa (78%).
- 5.4 - Os níveis de mercúrio, cádmio, chumbo, cobre e zinco encontrados no produto recuperado estão abaixo dos limites oficiais tolerados para alimentos em geral.

- 5.5 - A proteína recuperada, desengordurada com etanol, apresentou uma baixa solubilidade a pH 7 (8,70%). Todavia, esta solubilidade pôde ser aumentada para 21% quando a referida proteína foi ajustada a pH 8,5, antes da dessecação a temperatura ambiente, e para 40% quando eliminou-se o aquecimento na sua recuperação.
- 5.6 - A proteína recuperada, desengordurada com etanol, exibiu uma atividade emulsionante nula, a pH 7. Entretanto, quando a citada proteína foi ajustada a pH 8,5, antes da dessecação a temperatura ambiente, quando eliminou-se o aquecimento na sua recuperação e quando solubilizou-se a mesma a pH 12, neutralizando-a em seguida, sua capacidade de emulsificação foi de 25,5 ml, 38,6 ml e 100,9 ml de ôleo/100mg, respectivamente, significando, na mesma ordem, 31%, 48% e 125% da apresentada pela proteína de soja comercial (Proteimax 90 HG).
- 5.7 - A proteína contida no resíduo sólido resultante na recuperação protéica de cefalotórax de camarão-rosa, com base no cômputo químico, apresentou uma qualidade nutricional de 21% em relação ã caseína e de 35% comparada ã proteína da F.A.O/O.M.S, respectivamente, em função da limitação primária em triptofano.
- 5.8 - O rendimento em quitina foi de 2,7g ou 29g e em quitosana de 2,5g ou 26g, a partir de 100g de cefalotórax ou de 100g do mencionado resíduo, respectivamente.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AGEMIAN, H. & CHAU, A.S.Y. An improved digestion method for the extraction of mercury from environmental samples. Analyst, London, 101(1199):91-5, 1976.
- 2 - ANDERSON, C.G. et al. Antarctic krill (Euphausia superba) as a source of chitin and chitosan. In: MUZZARELLI, R.A.A. & PARISER, E.R., ed. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan:54-63, 1978.
- 3 - ASHFORD, N.A. et al. Industrial prospects for chitin and protein from shellfish wastes. A report on the First Marine Industries Business Strategy Program. Marine Industry Advisory Service. MIT Sea Grant Program. Massachusetts Institute of Technology. Cambridge, M S., 99pp. 1977.
- 4 - AUSTIN, P.R. Chitin: New facets of research. Science, Washington, D.C., 212:749-753, 1981.
- 5 - AVERBACH, B.L. Film-forming capability of chitosan. In: MUZZARELLI, R.A.A. & PARISER, E.R., ed. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan: 199-209, 1978.
- 6 - BALASSA, L.L. & PRUDDEN, J.F. Applications of chitin and chitosan in wound-healing acceleration. In: MUZZARELLI, R. A.A. & PARISER, E.R., ed. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan: 296-305, 1978.

- 7 - BECKMAN INSTRUMENTS INC. Instructions manual. Model 120 C Amino acid analyzer. California, 1969.
- 8 - BEUCHAT, L.R. Functional and eletrophoretic characteristics of succinylated peanut flour proteins. J. Agric. Food Chem., Washington, D.C., 25(2):258-61, 1977.
- 9 - BOUGH, W.A. Chitosan - a polymer from seafood waste, for use in treatment of food processing wastes and activated sludge. Process Biochem., London, 11(1):13-6, 1976.
- 10 - BOUGH, W.A. Reduction of suspended solids in vegetable canning waste effluents by coagulation with chitosan. J. Food Sci., Chicago, 40:297-301, 1975.
- 11 - BOUGH, W.A. & LANDES, D.R. Treatment of food-processing wastes with chitosan and nutritional evaluation of coagulated by-products. In: MUZZARELLI, R.A.A. & PARISER, E. R., ed., Proceedings of the First Insternational Conference on Chitin/Chitosan:218-30, 1978.
- 12 - BRASIL. Normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos. Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Diário Oficial, Brasília, 9 abr. 1965.
- 13 - BRASIL. Resolução nº 18. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Diário Oficial, Brasília, 9 dez. 1975.
- 14 - CHACÓN, C.L.R. Preparação de um extrato protéico com sabor e aroma de camarão. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia de Alimentos. 1976. 78 p.
- 15 - CHEFTEL, J.C. Proteins and amino acids. In: TANNEBAUM, S.R. ed. Nutritional and safety aspects of food processing. 153-215, Marcel Dekker, Inc. N.York, 1979.

- 16 - COOB III, B.F. & HYDER, K. Development of a process for preparing a fish protein concentrate with rehydration and emulsifying capacities. J. Food Sci., Chicago, 37:743-50, 1972.
- 17 - DAVIS, G.K. Effects of high calcium intakes on the absorption of other nutrients. Fed. Proc., Washington, D.C., 18:1119-23, 1959.
- 18 - DUBROW, D.L. et al. Effect of temperature on lipid extraction and functional properties of fish protein concentrate (FPC). J. Food Sci., Chicago, 38:1012-1015, 1973.
- 19 - EVANS, W.H. et al. Evaluation of a method for the determination of total cadmium, lead and nickel in foodstuffs using measurement by flame atomic-absorption spectrophotometry. Analyst, London, 103(1227):580-594, 1978.
- 20 - F.A.O./O.M.S. Necesidades de energía y de proteínas. Ser. Inf. Técn. Org. Mund. Salud, Ginebra, (522):1-138, 1973.
- 21 - F.A.O./W.H.O./U.N.I.C.E.F. PROTEIN ADVISORY GROUP - Guideline for preclinical testing of novel sources of protein. PAG Guideline, New York, (6) (Revised), 1972, 24 p.
- 22 - FERRO, P.V. & HAM, A.B. A simple spectrophotometric method for the determination of calcium. II. A semimicro method with reduced precipitation time. Am. J. Clin. Pathol., Philadelphia, 28:689-92, 1957.
- 23 - FINLEY, J.W. et al. Chill proofing beer with papain immobilized on chitin. Process Biochem., London, 14(7):12-13, 1979.
- 24 - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Nutrition Division Food Policy and Food Service. Amino acid content of foods and biological data on proteins. F.A.O. Nutr. Studies, Roma, (24), 1976, 285 p.

- 25 - FOSTER, A.B. & WEBBER, J.M. CHITIN. Adv. Carbohydr. Chem., New York, 15:371-93, 1960.
- 26 - GOTO, S. & SAWAMURA, T. Effect of excess calcium intake on absorption of nitrogen, fat, phosphorus and calcium in young rats. The use of organic calcium salt. J. Nutr. Sci. Vitaminol., Tokyo, 19:355-60, 1973.
- 27 - GOTO, S. & SAWAMURA, T. Effect of excess calcium intakes on absorption of nitrogen, phosphorus and calcium. Nutr. Rep. Int., Los Altos, 7(2):103-111, 1973.
- 28 - GREEN, J.H. & MATTICK, J.F. Possible methods for the utilization or disposal of fishery solid wastes. J. Food Qual., Westport, 1(3):229-51, 1977.
- 29 - HAPPICH, M.L. et al. Equations for predicting PER from amino acid analysis: a review and current scope of application. In: FRIEDMAN, M., ed. Protein nutritional quality of foods and feeds. Part 1. Assay methods - biological, biochemical and chemical. New York, Marcel Dekker, 1975, p. 125-35, v.1.
- 30 - HAUER, H. The chelating properties of Kytex H chitosan. In: MUZZARELLI, R.A.A. & PARISER, E.R., ed. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan :263-76, 1978.
- 31 - HORWITZ, W. ed. Official methods of analysis of the A.O.A.C. 13th ed. Washington, D.C., Assoc. Off. Agric. Chem., 1980, 1018 p.
- 32 - JOHNSON, E.L. & PENISTON, Q.P. Pollution abatement and by-product recovery in the shellfish industry. Eng. Bul. Ext. Ser. Purdue Univ., Lafayette, (140):497-513, 1971.

- 33 - JOHNSON, N. & LEONE, F.C. Statistics and experimental design in engineering and the physical sciences, New York, John Willey, 1967, 2v.
- 34 - KAMASASTRI, P.V. & PRABHU, P.V. Proteins from prawn shell waste. Res. Ind., New Delhi, 8:98-9, 1963.
- 35 - KINCAID, R.L. Biological availability of zinc from inorganic sources with excess dietary calcium. J. Dairy Sci., Urbana, 62(7):1081-5, 1979.
- 36 - KINSELLA, J.E. Functional properties of proteins in foods: A survey. C.R.C. Crit. Rev. Food. Sci. Nutr., Cleveland, 7(3):219-80, 1976.
- 37 - KNORR, D. Dye binding properties of chitin and chitosan. J. Food Sci., Chicago, 48:36, 37, 41, 1983.
- 38 - KNORR, D. Functional properties of chitin and chitosan. J. Food Sci., Chicago, 47(2):593-5, 1982.
- 39 - KONDOS, A.C. Nutritional evaluation of six protein concentrates for the pig. Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb., Melbourne, 17(85):263-7, 1977.
- 40 - KORSCHGEN, B.M. & BALDWIN, R.E. Fish protein concentrate as an emulsifier. J. Food Sci., Chicago, 38:179-80, 1973.
- 41 - LAJOLO, F.M. et al. Estudo bromatológico de concentrados proteicos obtidos a partir da Sardinella aurita e da Tilapia melanopleura. 1 - Ensaio das proteínas. Arch. Latinoam. Nutr., Caracas, 25(1):67-78, 1975.
- 42 - LAJOLO, F.M. et al. Importância da cor da ração, no consumo por ratos (Rattus norvegicus var. albinus). Rev. Fac. Farm. Bioquim., São Paulo, 7(1):95-103, 1969.

- 43 - LIN, M.J.Y. & HUMBERT, E.S. Certain functional properties of sunflower meal products. J. Food Sci., Chicago, 39:368 - 70, 1974.
- 44 - LIU, T.Y. & CHANG, Y.H. Hydrolyses of proteins with p-toluenesulfonic acid. J. Biol. Chem., Baltimore, 246:2842-8 , 1981.
- 45 - MARTIN, R.E. Krill as a protein source. Methods of recovery, potential uses and problems. Food Technol., Chicago, 33 (1):46-51, 1979.
- 46 - MASRI, M.S. et al. Insolubilizing enzymes with chitosan and chitosan-derived polymers. In: MUZZARELLI, R.A.A. & PARISER, E.R., ed. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan:355-63, 1978.
- 47 - MASRI, M.S. & RANDALL, V.G. Chitosan and chitosan derivatives for removal toxic metallic ions from manufacturing-plant waste streams. In: MUZZARELLI, R.A.A. & PARISER, E.R. ed. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan:277-87, 1978.
- 48 - MASTERS, P.M. & FRIEDMAN, M. Amino acid racemization in alkali-treated food proteins. Chemistry, toxicology and nutritional consequences. In: WHITAKER, J.R. & FUJIMAKI, M. ed. Chemical deterioration of proteins:165-94. American Chemical Society Symposium Series, 123, A.C.S., Washington, D.C., 1980.
- 49 - McWATTERS, K.H. & HOLMES, M.R. Influence of the pH and salt concentration on nitrogen solubility and emulsion properties of soy flour. J. Food Sci., Chicago, 44:770-3, 1979.

- 50 - MEYERS, S.P. & RUTLEDGE, J.E. Economic utilization of crustacean meals. Feedstuffs, Minneapolis, 43(43):46 , 1971.
- 51 - MEYERS, S.P. & RUTLEDGE, J.E. Utilization of economically-valuable byproducts from shrimp processing industry. In: WORTHEN, L.R., ed. Proceedings of the 3rd Conference on Food-Drugs from the Sea:75-85, 1973.
- 52 - MILLER, R. & GRONINGER Jr., H.S. Functional properties of enzyme modified acylated fish protein derivatives. J. Food Sci., Chicago, 41:268-72, 1976.
- 53 - MIYAUCHI, D. & STEINBERG, M. Machine separations of edible flesh from fish. Fish. Ind. Res., Washington, D.C., 6(4):165-71, 1970.
- 54 - MUZZARELLI, R.A.A. Modified chitosans and their chromatographic performances. In: MUZZARELLI, R.A.A. & PARISER, E. R. ed., Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan:335-47, 1978.
- 55 - NAGYVARY, J.J. et al. The hypolipidemic activity of chitosan and other polysaccharides in rats. Nutr. Rep. Int., Los Altos, 20(5):677-84, 1979.
- 56 - PAGE, R.K. et al. Calcium toxicosis in broiler chicks. Avian Dis., College Station, 23(4):1055-9, 1979.
- 57 - PENISTON, Q.P. et al. A new process for recovery of by-products from shellfish waste. Eng. Bul. Ext. Ser. Purdue Univ., Lafayette, (135):402-12, 1969.
- 58 - RASEKH, J. & METZ, A. Acid precipitated fish protein isolate exhibits good functional properties. Food Prod. Dev., Chicago, 7:18,20,22,24, 1973.

- 59 - ROMO, C.R. & ANDERSON, C.G. Determination of optimum parameters for protein isolation from krill (Euphausia superba) waste products. J. Food Sci., Chicago, 44:1425-9, 1979.
- 60 - RUTHERFORD III, F.A. & AUSTIN, P.R. Marine chitin properties and solvents. In: MUZZARELLI, R.A.A. & PARISER, E.R., ed. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan:182-92, 1978.
- 61 - RUTLEDGE, J.E. Decalcification of crustacean meals. J. Agric. Food Chem., Washington, D.C., 19(2):236-7, 1971.
- 62 - SAKAGUCHI, T. et al. Adsorption of uranium by chitin phosphate. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 45(10):2191-5, 1981.
- 63 - SAMESHIMA, M. et al. Constituents of the amino acids composed of the protein in the exoskeletons of the crustacea. Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ., Kagoshima, 22(1):33-7, 1973.
- 64 - SHANE, S.M. et al. Avian nephrosis associated with high dietary calcium. Fed. Proc., Washington, D.C., 27(2):312, 1968.
- 65 - SIMPSON, K.L. The recovery of protein and pigments from shrimp and crab meals and their use in salmonid pigmentation. In: MUZZARELLI, R.A.A. & PARISER, E.R. ed., Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan:253-62, 1978.
- 66 - SIKORSKI, Z.E. & NACZK, M. Modification of technological properties of fish protein concentrates. C.R.C. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., Cleveland, 14(3):201-30, 1981.
- 67 - SMITH Jr, P. et al. Improved rapid method for determining total lipids in fish meal. Commer. Fish. Rev., Washington, D.C., 26(7):1-5, 1964.

- 68 - SPINELLI, J. et al. Composition, processing and utilization of red crab (Pleuroncodes planipes) as an aquacultural feed ingredient. J. Fish. Res. Board Can., Ottawa, 31: 1025-9, 1974.
- 69 - SPINELLI, J. et al. The fish protein concentrate story. 13- Aqueous phosphate processing. Food Technol., Chicago, 25: 713-7, 1971.
- 70 - STEPHENS, N.L. et al. Preparation and evaluation of two microbiological media from shrimp heads and hulls. Appl. Environ. Microbiol., Washington, D.C., 31(1):1-6, 1976.
- 71 - SUGANO, M. et al. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, 33 (4):787-793, 1980.
- 72 - SYNOWIECKI, J. et al. Immobilization of amylases on krill chitin. Food Chem., Barking, 8(4):239-46, 1982.
- 73 - SYNOWIECKI, J. et al. Immobilization of enzymes on krill chitin activated by formaldehyde. Biotechnol. Bioeng., New York, 24(8):1871-6, 1982.
- 74 - SYNOWIECKI, J. et al. The activity of immobilized enzymes on different krill chitin preparations. Biotechnol. Bioeng., New York, 23(10):2211-5, 1981.
- 75 - TAKEDA, M. Use of chitin powder as adsorbent in thin-layer chromatography. In: MUZZARELLI, R.A.A. & PARISER, E.R., ed. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan:355-63, 1978.
- 76 - TANNENBAUM, S.R. et al. Solubilization of fish protein concentrate. 1 - An alkaline process. Food Technol., Chicago, 24:604-7, 1970.

- 77 - TENUTA FILHO, A. & ZUCAS, S.M. Cefalotórax de camarão-rosa .
II. Isolamento e caracterização químico-nutricional de sua
proteína. Bol. Inst. Oceanogr., São Paulo, 30(1):49-52,
1981.
- 78 - TENUTA FILHO, A. & ZUCAS, S.M. Celalotórax de camarão-rosa.
I. Valor nutricional da proteína de sua farinha. Bol.
Inst. Oceanogr., São Paulo, 30(1):41-7, 1981.
- 79 - TENUTA FILHO, A. & ZUCAS, S.M. Cefalotórax de camarão-rosa.
III. Valor nutricional da proteína isolada. Bol. Inst.
Oceanogr., São Paulo, 30(1):53-5, 1981.
- 80 - THURSTON, C.E. & MacMASTER, P.P. The carbonate content of some
fish and shellfish meals. J. Assoc. Off. Agric. Chem.,
Washington, D.C., 42(4):699-702, 1959.
- 81 - TOMA, R.B. & JAMES, W.H. Nutritional evaluation of protein
from shrimp cannery effluent (shrimp waste protein). J.
Agric. Food Chem., Washington, D.C., 23(6):1168-71, 1975.
- 82 - VENUGOPALAN, V. et al. Protein from blanch liquor. Fish.
Technol., Ernakulan, 7(2):143-5, 1970.
- 83 - WANG, J.C. & KINSELLA, J.E. Functional properties of novel
proteins: Alfalfa leaf protein. J. Food Sci., Chicago ,
41:286-92, 1976.
- 84 - WARRIER, S.B. & NINJOUR, V. Fish protein concentrate (FPC)
from bombay duck isolated by radiation-heat combination
procedure: functional and nutritional properties. J. Food
Sci., Chicago, 46:234-8, 1981.
- 85 - WHITAKER, J.R. Changes occurings in proteins in alkaline
solution. In: WHITAKER, J.R. & FUJIMAKI, M. ed.
Chemical deterioration of proteins:145-63, American Chemical
Society Symposium Series, 123. A.C.S, Washington, D.C. ,
1980.

- 86 - YAKU, F. & KOSHIJIMA, T. Chitosan-metal complexes and their functions. In: MUZZARELLI, R.A.A. & PARISER, E.R. ed. Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan:386-405, 1978.
- 87 - ZUCAS, S.M. et al. Gaiola metabólica para ratos, testada por meio de zinco radioativo (^{65}Zn). Rev. Fac. Farm. Bioquim., São Paulo, 7(2):353-9, 1969.

RESUMO

Foi desenvolvido um método de recuperação de proteína de cefalotórax de camarão-rosa (Penaeus brasiliensis e Penaeus paulensis), tendo como base a separação física e a insolubilização por precipitação isoelétrica (pH 4,5) e aquecimento (70-75°C/5min), caracterizando-se posteriormente o produto obtido e o resíduo sólido resultante.

O método empregado propiciou um rendimento de cerca de 2% e a proteína recuperada mostrou-se acompanhada de reduzida quantidade de cálcio (0,03%) e quitina (0,5%) e de níveis de metais tóxicos (Hg, Cd, Pb, Cu e Zn) muito abaixo de limites permitidos em alimentos. Com base no cálculo químico dos aminoácidos essenciais, a proteína obtida apresentou uma qualidade nutricional de 54% e de 90%, em relação à caseína e à proteína da F.A.O./O.M.S., respectivamente, limitada primariamente pelo triptofano. A eficiência desta proteína em promover o crescimento dos animais foi de 81%, comparada à caseína, prejudicada parcialmente por sua digestibilidade (78%). A solubilidade da proteína estudada foi baixa a pH 7 (8,70%) e pôde ser melhorada (20 a 97,5%) através de tratamento alcalino e/ou eliminação do aquecimento na recuperação da mesma. Sua capacidade de emulsificação foi de 31% a 125% comparada à da proteína de soja comercial (Proteimax 90 HG), quando adotou-se também o tratamento alcalino e/ou a eliminação do aquecimento na sua recuperação.

Com base no cálculo químico dos aminoácidos essenciais ,

a qualidade nutricional da proteína do resíduo foi de 21% e de 35%, respectivamente em relação à caseína e à proteína da F.A.O./O.M.S., com limitação primária em triptofano. O rendimento em quitina e em quitosana atingiu 2,7g e 2,5g a partir do resíduo equivalente a 100g de cefalotórax ou 29g e 26g para cada 100g do mesmo, respectivamente.

SUMMARY

A method for the protein recuperation from pink shrimp (Penaeus brasiliensis and Penaeus paulensis) cephalotorax was developed and the recuperated product and generated solid waste were characterized. The physical separation and protein insolubilization by isoelectric precipitation (pH4,5) and heating (70-75°C/5min) were the base of this method. The method promoted a yield of 2% and the protein product showed low quantities of calcium (0,03%) and chitin (0,5%) and very low quantities of toxic metals (Hg, Cd, Pb, Cu and Zn) in relation to limits permitted in foods. Based on the essential amino acids chemical score the recuperated protein showed a nutritional quality of 54% and 90%, compared to casein and F.A.O/0.M.S reference protein, respectively, primarily limited in triptophan. The efficiency of this protein in animal growth promotion was of 81% in relation to casein, limited partially by its digestibility (78%). The solubility of the protein was low at pH 7 (8,70%) and was improved (20 to 97,5%) through the alkaline treatment and/or heating elimination in its recuperation. The emulsification capacity of this protein was from 31% to 125% compared to commercial soy protein (Proteimax 90 HG) when the alkaline treatment and/or heating elimination was also used. According to the essential amino acids chemical score the protein nutritional quality of the solid waste was of 21% and

35%, respectively, in relation to casein and F.A.O/0.M.S. reference protein, with primary limitation in triptophan. The yield in chitin and chitosan was 2,7g and 2,5g/100g cephalotorax or 29g and 26g/100g solid waste, respectively.