

Estudo da solubilidade das proteínas da clara do ovo em função da temperatura e do pH

D. H. G. Pelegrine e C. A. Gasparetto

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP
13083-970 Campinas, SP
dhguima@aol.com

(Recebido: 8 de setembro de 2003)

Resumo: Neste trabalho foi analisada a influência da temperatura e do pH na solubilidade das proteínas presentes na clara do ovo. A solubilidade protéica foi determinada experimentalmente para temperaturas na faixa de 40-60 °C e pHs entre 6,0 e 9,0 que é a faixa aceitável para a clara de ovo e seus derivados. Os resultados mostraram que tanto a temperatura quanto o pH exerceram influência na solubilidade dessas proteínas e há interação entre essas duas variáveis. Além disso, valores mínimos da solubilidade protéica foram alcançados a 60 °C, sendo a coagulação das proteínas da clara de ovo, a partir dessa temperatura, uma possível razão desse fenômeno. Em pHs próximos à neutralidade (6,0-6,3), a solubilidade protéica diminuiu com o aumento da temperatura a partir de 57 °C e aumentou para temperaturas na faixa de 40 e 50 °C, reforçando as afirmações de que a partir de 57,5 °C as proteínas presentes na clara de ovo são desnaturadas.

Palavras-chave: *clara de ovo, solubilidade, proteína*

Abstract: An integrated study was conducted on the effects of temperature and pH on the solubility of white egg proteins. The solubility was determined experimentally in the range of 40-60 °C for temperature and 6.0-9.0 for pH. The results showed that, so the temperature as the pH influenced in the protein solubility, and these properties have great interaction. Besides, that protein solubility minimum values were reached at 60 °C, and the protein coagulation of the white egg, starting from that temperature, is a possible reason of that phenomenon. In neutral pHs (6,0-6,3) the protein solubility decreased with the temperature starting from 57 °C and it increased with temperature in 40-50 °C range, reinforcing the statements that at 57,5 °C the proteins present in the egg white are denatured.

Key words: *egg white, solubility, protein*

1 Introdução

A solubilidade protéica é difícil de ser definida, já que as proteínas em meio aquoso podem formar uma solução verdadeira, uma solução coloidal ou uma suspensão estável de partículas insolúveis (BORDERÍAS & MONTEIRO, 1988). Termodinamicamente, solubilidade protéica é a concentração de proteína no solvente em um sistema simples ou de duas fases em estado de equilíbrio (VOJDANI, 1996). Matematicamente, o grau de solubilidade de uma proteína é a quantidade de proteína presente na fase líquida em relação à quantidade total de proteína nas fases líquida e sólida em equilíbrio. A solubilidade protéica também pode ser definida como sendo um parâmetro operacional determinado pela retenção de proteína no sobrenadante após centrifugação da solução por determinado período de tempo e sob determinada força centrífuga (MORRISSEY *et al.*, 1982).

A importância primária da solubilidade protéica está no fato de que esta influencia muitas outras propriedades funcionais, tais como a gelatinização, emulsificação e formação de espuma. Ou seja, o fator primordial para que as proteínas exibam características gelatinizantes, espumantes e emulsificantes é que tais proteínas sejam solúveis (NAKAI & CHAN, 1985; CÂNDIDO, 1998). Em outras palavras, uma diminuição na solubilidade protéica afeta de maneira desfavorável a sua funcionalidade; por exemplo, a gelatinização e a viscosidade resultam das propriedades hidrodinâmicas das proteínas, que por sua vez são afetadas pelo tamanho e forma da proteína e são independentes da composição e distribuição dos aminoácidos. A solubilidade da proteína em um sistema de multicomponentes é de grande importância na escolha de métodos para a produção de isolados protéicos, fracionamento de proteínas e purificação.

Nos tempos modernos, a importância na comercialização dos produtos derivados do ovo tem sido grande no mercado internacional (STADELMAN, 1995). Devido às suas propriedades funcionais únicas, tais como gelatinização e formação de espuma, as proteínas da clara do ovo de galinha têm sido extensivamente usadas como ingredientes em alimentos processados, sendo ingredientes desejáveis em muitos alimentos, tais como nos produtos de padaria, merengues, biscoitos e derivados de carne (MINE, 1995; WONGF *et al.*, 1996). Daí a importância de um estudo detalhado da solubilidade das proteínas presentes na clara do ovo que, por sua vez, é influenciada, de um modo geral, pela maior ou menor afinidade das suas moléculas pelo solvente. No caso dos alimentos, tal solvente é a água, e daí o fato de a solubilidade ser classificada como uma propriedade hidrofílica.

Dentre os vários termos utilizados para designar a solubilidade protéica, encontram-se: proteínas solúveis em água (WPS), proteínas dispersas em água (WDP), índice de dispersibilidade da proteína (PDI) e índice de solubilidade do nitrogênio (NSI) (CARNEIRO, 1997). Uma metodologia padronizada para determinação da solubilidade protéica foi desenvolvida por MORR *et al.* (1985), através da modificação do NSI, visando a sua aplicação a inúmeros produtos protéicos e à eliminação dos erros quando o método é usado por diferentes laboratórios.

As referências mais recentes relatam, como os principais fatores responsáveis pela solubilidade protéica, o pH e a temperatura da solução. O pH afeta a natureza e a distribuição de cargas de uma proteína. Em geral, as proteínas são mais solúveis em pHs baixos (ácidos) ou elevados (alcalinos) por causa do excesso de cargas do mesmo sinal, produzindo repulsão entre as moléculas e, conseqüentemente, contribuindo para sua maior solubilidade.

De acordo com as observações de vários autores (KAKALIS & REGENSTEIN, 1986; WIT, 1989; VOJDANI, 1996; WONG *et al.*, 1996; MANN & MALIK, 1996), quando uma solução protéica está no seu ponto isoeletrico, ou seja, quando a proteína num sistema aquoso apresenta carga líquida nula, as interações proteína-proteína aumentam, pois as forças eletrostáticas moleculares estão num mínimo; conseqüentemente, menos água interage com as moléculas de proteína, condição favorável para que as moléculas de proteína se aproximem, agreguem e precipitem. Ou seja, quanto mais próximo for o pH de uma solução protéica do seu ponto isoeletrico (pI), mais baixa será sua solubilidade. Em pH diferentes do ponto isoeletrico ocorre um aumento da solubilidade protéica, devido ao aparecimento de cargas positivas ou negativas em excesso sobre as cadeias de proteínas, que favorecem a interação carga-momento do dipolo da água (CARNEIRO, 1997).

A temperatura também é outro fator que mais influencia na solubilidade protéica, já que quando esta aumenta suficientemente por um determinado período de tempo, a proteína é desnaturada devido à exposição dos grupos sulfidril (-SH), inicialmente no interior das moléculas protéicas (SOOD *et al.*, 1976; MINE, 1996; KIM, 1998; LANGERDORF *et al.*, 1999).

2 Parte experimental

2.1 Proteínas da clara de ovo

As amostras de clara de ovo desidratadas foram adquiridas junto à HL Brasil Indústria e Comércio Ltda, embaladas em sacos de polietileno atóxico e com papel *kraft* multifolheado. Foi adquirido um lote de tamanho suficiente para a realização da determinação da composição centesimal e das análises da solubilidade protéica.

2.2 Procedimentos

2.2.1 Análises físico-químicas

Foram realizadas as seguintes análises físico-químicas para a caracterização do produto:

1. Umidade (A.O.A.C., 1980 - Method 16192);
2. Cinzas (A.O.A.C., 1980 - Method 16196);
3. Lipídios Totais (BLIGH & DYER, 1959);
4. Proteínas (A.O.A.C., 1980 - Method 38012).

2.3 Determinação da solubilidade protéica

A determinação da solubilidade protéica seguiu a metodologia proposta por MORR *et al.* (1985). Dessa forma, cerca de 500 mg de amostra foram pesados em balança semi-analítica BOSCH-SEA200, usando um béquer de 100 ml e, à amostra foi adicionada aproximadamente 10 ml de solução de NaCl 0,1 mol l⁻¹ até a obtenção de uma pasta homogênea. A seguir, adicionou-se mais NaCl 0,1 mol l⁻¹ até o volume do béquer completar 40 ml. Em seguida, a mistura foi transferida para béqueres encamisados, acoplados a um banho termostático Nova Técnica, através do qual a temperatura foi mantida a um certo valor, de acordo com o interesse de cada experimento. As temperaturas referentes a este experimento variou entre 40 a 60° C, que é a máxima temperatura permitida para a utilização do pHmetro. O pH de cada amostra foi ajustado ao valor de interesse e mantido através da adição de soluções de NaOH 0,1N ou HCl 0,1N, se necessário, após a leitura em pHmetro Mettler Toledo - modelo 320. O diagrama esquemático desse procedimento está ilustrado na Figura 1. Dessa maneira, o pH da solução protéica da clara de ovo variou entre 6,0 e 9,0, que é a faixa aceitável para o produto. Após agitação das amostras, durante 1 hora, em agitador magnético FISATOM - modelo 752A, a dispersão foi transferida para um balão volumétrico de 50 ml, onde o volume foi completado com NaCl 0,1 mol l⁻¹. Em seguida, a solução foi centrifugada a 13500 rpm por 30 minutos a 4° C, em centrífuga SORVALL INSTRUMENTS - modelo RC5C com rotor SS-34, e o sobrenadante foi filtrado em papel Whatman nº 2. Aliquotas de 2 ml foram tomadas e o conteúdo de proteínas solúvel nelas presente foi determinado usando-se o sistema micro-Kjeldahl (A.O.A.C., 1980 - Method 38012).

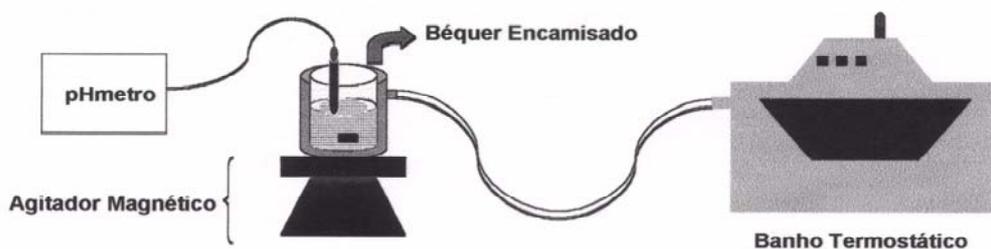


Figura 1. Diagrama esquemático para adequar a solução às condições de temperatura e pH.

A porcentagem de proteína solúvel foi calculada de acordo com a seguinte equação

$$P.S. = \frac{[A(mg/ml) 50]}{\left[W(mg) \frac{S}{100} \right]} 100$$

onde $P.S.$ = teor de proteínas solúveis presentes na amostra [%];

A = concentração protéica do sobrenadante [mg/ml];

W = peso da amostra [mg];

S = concentração de proteína [%]

Cada experimento foi realizado em quadruplicada, sendo o teor de proteína solúvel resultante, a média aritmética dos valores das quatro repetições.

3 Discussão

3.1 Caracterização do produto

O lote do produto que foi utilizado na determinação da solubilidade protéica apresentou composição centesimal característica do produto, cujos resultados são apresentados na Tabela 1.

Produto	Clara de ovo
Umidade (%)	5,73
Cinzas (%)	0,62
Proteínas (%)	76,42
Lipídios Totais (%)	0,35

Tabela 1. Composição centesimal da clara do ovo em pó.

Temperatura ($^{\circ}C$)	pH		A (g/ml)	% P.S.
40	6,00	0,5086	0,007074	91,05
	6,43	0,5086	0,007003	90,09
	7,50	0,5151	0,007878	100,06
	8,56	0,5093	0,007711	99,06
	9,00	0,5022	0,007683	99,97
43	6,00	0,5056	0,006960	90,07
	6,43	0,5022	0,007123	92,78
	7,50	0,5125	0,007414	94,66
	8,56	0,5075	0,007708	99,37
	9,00	0,5177	0,007604	96,10
50	6,00	0,5054	0,007315	94,70
	6,43	0,5032	0,007233	94,05
	7,50	0,5088	0,007213	92,75
	8,56	0,5030	0,007250	94,31
	9,00	0,5062	0,007341	94,62
57	6,00	0,5319	0,006778	83,37
	6,43	0,5032	0,005594	73,12
	7,50	0,5088	0,007304	93,83
	8,56	0,5030	0,006016	78,16
	9,00	0,5062	0,007454	95,45
60	6,00	0,5000	0,005225	68,37
	6,43	0,5064	0,005734	74,08
	7,50	0,5039	0,006673	86,64
	8,56	0,5021	0,007396	96,38
	9,00	0,5179	0,007376	93,03

Tabela 2 - Valores de solubilidade protéica da clara do ovo.

3.2 Medidas da solubilidade protéica

Os experimentos foram realizados em quadruplicadas para cada situação particular de temperatura e pH. A tabela a seguir mostra as médias dos valores da solubilidade protéica e dos parâmetros necessários para a sua determinação. As curvas de solubilidade das proteínas da clara de ovo estão esboçadas nas figuras posteriores, assim como o gráfico da superfície de resposta e a tabela da análise de variância (ANOVA).

Nas Figuras 2 e 3 pode-se observar que, para qualquer valor de pH, valores mínimos da solubilidade protéica foram alcançados a 60 °C. A coagulação das proteínas da clara de ovo a partir dessa temperatura pode ser a razão desse fenômeno. Acima de 57,5 °C a clara de ovo torna-se pegajosa e gelatinosa devido à desnaturação protéica e/ou rápida evaporação da água presente no produto (PUNIDADAS & KELLAR, 1999). Tal afirmação pode ser observada no presente trabalho, já que em pHs próximos à neutralidade (6,0-6,3) a solubilidade protéica diminuiu com valores de temperatura superiores a 57 °C e aumentou entre 40 e 50 °C. No pH de 7,5, observa-se que a desnaturação protéica ocorreu somente à 60 °C, já que a solubilidade a 57 °C é maior do que a de 50 °C.

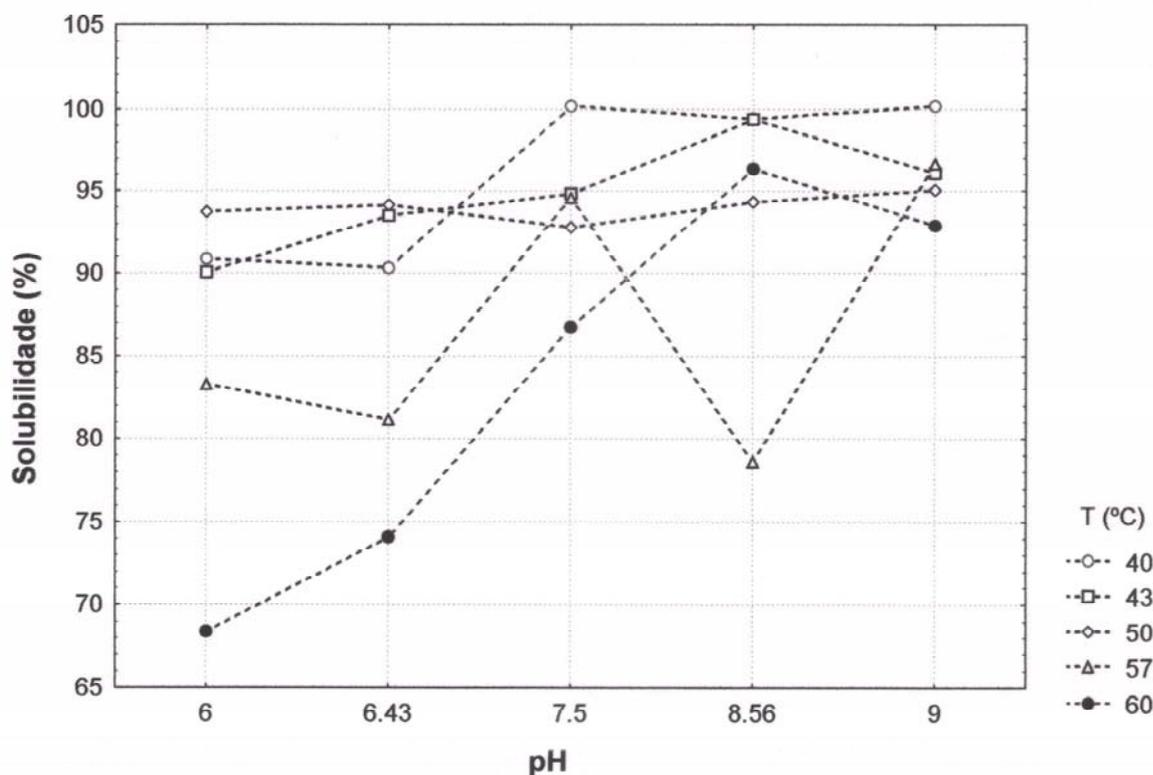


Figura 2. Efeito da variação do pH na solubilidade das proteínas da clara do ovo nas diversas temperaturas estudadas.

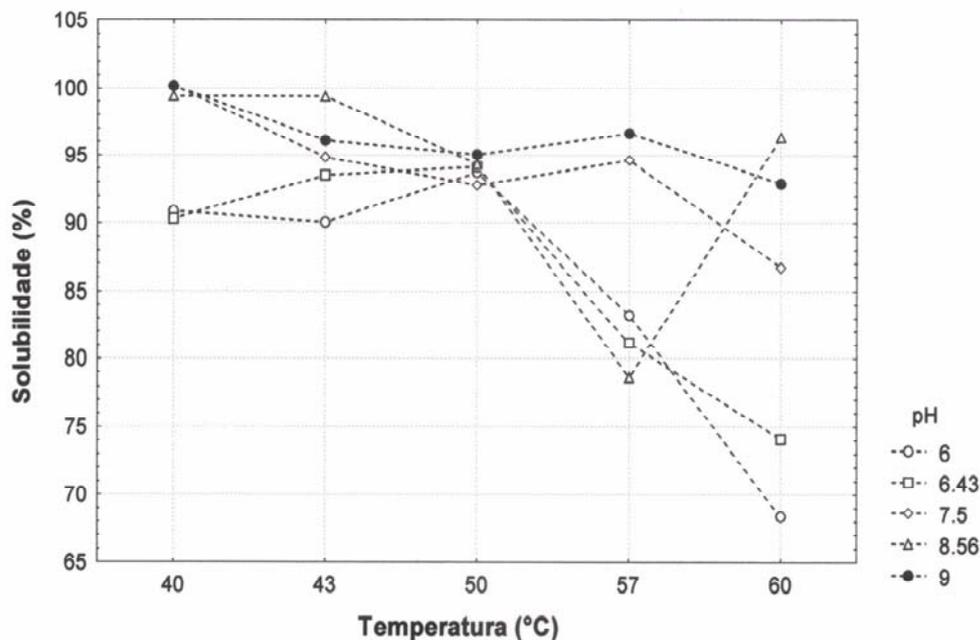


Figura 3. Efeitos da variação da temperatura na solubilidade das proteínas da clara de ovo nos diversos pHs estudados.

A clara de ovo em pó é uma mistura contendo vários tipos de proteínas, cada uma com um ponto isoelétrico diferente. Portanto, a menor solubilidade não ocorre necessariamente no ponto isoelétrico da ovoalbumina, principal proteína presente na clara de ovo. Quando o pH da solução aumentou para 9,0, a coagulação protéica foi observada para qualquer temperatura devido ao fato de a solubilidade diminuir com o aumento da temperatura. Uma possível explicação desse efeito é que o pH em questão está bem próximo ao pI da Avidina.

3.3 Análise estatística

Os gráficos da superfície de resposta da solubilidade protéica em função do pH e temperatura, assim como os resultados da análise de variância, serão apresentados a seguir.

Pela análise de variância da Tabela 3, verifica-se que tanto a temperatura quanto o pH exercem influência na solubilidade das proteínas da clara de ovo, e que há interação entre essas duas variáveis. Por exemplo: pode ser verificado nas Figuras 2 e 3, que para o pH de 8,56 e temperatura de 57°C, houve uma queda muito acentuada na solubilidade protéica da clara do ovo indicando que, no caso de se necessitar trabalhar com o pH em torno desse valor, a temperatura de 57°C deverá ser evitada a todo custo.

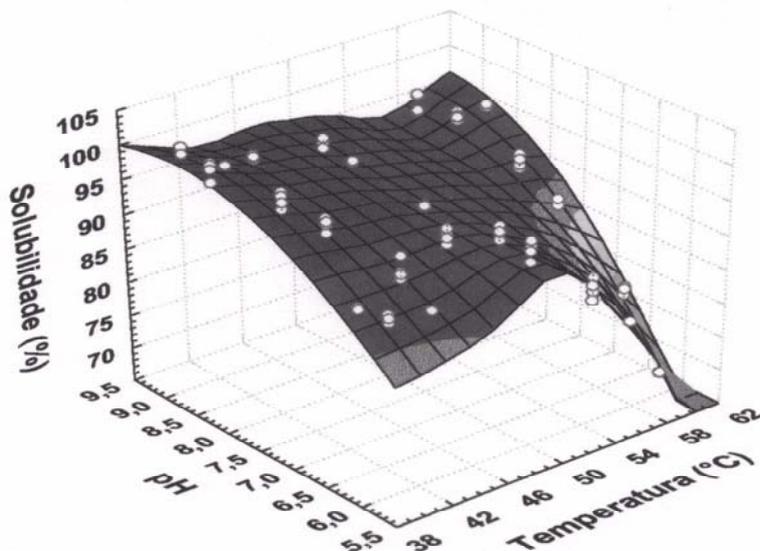


Figura 4. Superfície de resposta mostrando a influência do pH e da temperatura na solubilidade das proteínas presentes na clara de ovo em pó.

Fonte variação	soma dos quadrados	graus de liberdade	quadrado médio	F	F_{tab} ($\alpha = 1\%$)
Temperatura	2412,9628	4	603,2407	912,3531	3,6
pH	1872,8472	4	468,2118	708,2501	3,6
Temperatura-pH	2149,2560	16	134,3285	20,31947	2,3
Erro	49,81225	75	0,661083	-	
Total	6484,8782	99	-	-	

Tabela 3. Quadro de análise de variância (clara de ovo em pó).

4 Conclusões

Do estudo da solubilidade protéica concluiu-se que:

- tanto a temperatura quanto o pH influenciaram na solubilidade protéica, havendo evidência da interação entre essas duas propriedades;
- para a clara de ovo em pó, valores mínimos da solubilidade foram alcançados a 60° C, para qualquer valor de pH, o que indica uma possível coagulação das proteínas a partir dessa temperatura.

Agradecimentos

À CAPES e ao CNPq, pela concessão de auxílio financeiro à pesquisa.

À HL Brasil Indústria e Comércio Ltda, pelo fornecimento das amostras de clara de ovo em pó.

Referências

- A. O. A. C. *Official Methods of Analysis*. Washington: Sidney Willians, 1980.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochem. Physiol.*, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BORDERÍAS, A. J.; MONTERO, P. Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. *Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, v. 28, n. 2, p. 159-169, 1988.
- CANDIDO, L. M. B. *Obtenção de Concentrados e Hidrolisados Protéicos de Tilápia do Nilo (Oreochromus Niloticus): composição, propriedades nutritivas e funcionais*. Campinas: 1998. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CARNEIRO, J. G. M. *Características Funcionais de Concentrados Protéicos de Soro de Leite de Cabras*. Campinas, 1997. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- KAKALIS, L. T.; REGENSTEIN, J. M. Effect of pH and salts on the solubility of egg white protein. *Journal of Food Science*, v. 51, n. 6, p. 1445-1455, 1986.
- KIM, J.C. Milk portein/stainless steel interaction relevant to the initial stage of fouling in thermal processing. *Journal of Food Process Engineering*, v. 21, n. 5, p. 369-386, 1998.
- LANGENDORFF, V.; CUVELIER, G.; LAUNAY, B.; MICHIN, C.; PARKER, A.; KRUIF, C. G. Casein micelle/iota carragenan interactions in milk: influence of temperature. *Food Hydrocolloids*, v. 13, n.1, p. 211-218, 1999.
- MANN, B.; MALIK, R. C.; Studies on some functional characteristics of whey protein-polysaccharide complex. *Journal of Food Science and Technology*, v. 33, n. 3, p. 202-206, 1996.
- MINE, Y. Recent advances in the understanding off egg white protein functionally. *Trends in Food Science and Technology*, v. 6, n. 7, p. 25-232, 1995.
- MINE, Y. Effect of pH during the dry heating on the gelling properties of egg white proteins. *Food Research International*, v. 29, n. 2, p. 155-161, 1996.
- MORR, C. V.; GERMAN, B.; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B. A.; MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standardised food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, 1985.
- MORRISSEY, P. A.; MULVIHILL, D. M.; O'NEILL, M. O. Functional Properties of Muscle Proteins. In: *Developments in Food Proteins-5*, cap. 5, p. 195-256, London: Blackie Academic & Professional, 1982.

- NAKAI, S.; CHAN, L. Structure modification and functionality of whey proteins: quantitative structure-activity relationship approach. *Journal of Dairy Science*, v. 68, n. 10, p. 2763-2772, 1985.
- PUNIDADAS, P.; KELLAR, M. Selected physical properties of liquid egg products at pasteurisation temperatures. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 23, n. 2, p. 153-168, 1999.
- SOOD, S. M.; SIDHU, K. S.; DEWAN, R. K. Voluminosity of bovine and buffalo casein micelles at different temperatures. *Milchwissenschaft*, v. 31, n. 8, p. 470-473, 1976.
- STADELMAN, W. J. The Egg Industry. In: *Egg Science and Technology*, cap. 1, p. 1-7, New York: The Haworth Press, 1995.
- VOJDANI, F. Solubility. In: *Methods of Testing Protein Functionality*, cap. 2, p. 11-60, London: Blackie Academic & Professional, 1996.
- WIT, J. N. 1989. Functional Properties of Whey Proteins. In: *Developments in Dairy Chemistry-4*, cap. 8, p. 285-321, London: Elsevier Applied Science, 1989.
- WONG, Y. C.; HERALD, T. J.; HACHMEISTER, K. A. Comparison between irradiated and thermally pasteurised liquid egg white on functional, physical and microbiological properties. *Poultry Science*, v. 75, n. 6, p. 803-808, 1996.