



MARIELLE MARIA DE OLIVEIRA PAULA

**OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF PROTEIN
ISOLATES FROM PORCINE HEART AND LIVER**

**LAVRAS - MG
2022**

MARIELLE MARIA DE OLIVEIRA PAULA

**OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF PROTEIN ISOLATES FROM
PORCINE HEART AND LIVER**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Prof. Dr. Eduardo Mendes Ramos

Coorientador

Prof. Dr. Paulo Rogério Fontes

LAVRAS-MG

2022

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Paula, Marielle Maria de Oliveira.

“Obtaining and characterization of protein isolates from porcine
heart and liver” / Marielle Maria de Oliveira Paula. - 2022.

150 p. : il.

Orientador(a): Eduardo Mendes Ramos.

Coorientador(a): Paulo Rogério Fontes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. By-products porcine. 2. Functional properties. 3. Protein
ingredient. I. Ramos, Eduardo Mendes. II. Fontes, Paulo Rogério.

MARIELLE MARIA DE OLIVEIRA PAULA

**OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF PROTEIN ISOLATES FROM
PORCINE HEART AND LIVER**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS PROTEICOS DE CORAÇÃO E
FÍGADO SUÍNO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 12 de agosto de 2022.

Dra. Alcineia de Lemos Souza Ramos
Dr. Paulo Rogério Fontes
Dra. Simone de Fátima Viana da Cunha
Dr. Augusto Aloísio Benevenuto Júnior

UFLA
UFV
UFOP
IF Sudeste MG

Prof. Dr. Eduardo Mendes Ramos
Orientador

**LAVRAS-MG
2022**

*Á Deus,
Ao meu noivo, agora minha “estrelinha”,
Aos meus pais, Manoel e Tânia,
E a todos familiares e amigos,
Com amor, dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e meu Pai Eterno, dedico! Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas. Por trás deste título há uma história de amor, luta, renúncia, mas acima de tudo, de restituição e cuidado! Em tudo há um propósito! Obrigado, meu Senhor, por ter me concedido força, sabedoria, coragem e acima de tudo fé para a realização deste sonho! Em cada momento da minha vida te louvarei e agradecerei, com a minha mais eterna gratidão!

À minha Nossa Senhora, minha mãezinha, obrigada por ser meu porto seguro e ter me protegido com seu manto sagrado, me guiando e amparando na caminhada.

À Universidade Federal de Lavras, em especial, ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), pela estrutura concedida para formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos (PPGCA), pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto (CNPq; 430206/2016-0), agradeço. Também à Fundação para a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; CVZ APQ-02015-15 e CVZ APQ 02904-17), pelo auxílio e financiamento à pesquisa.

À Nutrili Alimentos, em especial a Amanda Amador, por toda ajuda durante a coleta e transporte dos subprodutos, tornando possível a execução inicial do experimento. Muito obrigada por toda ajuda e prontidão!

Agradeço ao Departamento de Nutrição (DNU), na figura do técnico Geraldo, pela disponibilidade para liofilizar as amostras utilizadas no projeto. Muito obrigada por tudo Geraldo, sem esta etapa nada teria acontecido! Você é incrível!

Ao meu orientador, professor Dr. Eduardo Mendes Ramos, obrigada por exatamente tudo! Ao decorrer destes seis anos, você se tornou não só um exemplo de profissional, no qual é minha referência, mais também de pessoa/ser humano. Obrigada por toda ajuda, ensinamentos, paciência e acima de tudo por ter acreditado em mim, auxiliando-me em cada detalhe, tornando a caminhada mais tranquila e especial. Levarei os seus ensinamentos comigo por onde quer que eu vá!

À professora Alcinéia Ramos, o meu mais sincero obrigada! Você me mostrou que por trás da grande profissional/mãe que é, existe também uma amiga, que pude, e sei que posso contar quando precisar. Gratidão por tudo o que fez por mim, principalmente por todos os

conselhos, ensinamentos e por ter me recebido tão bem no LabCarnes! Obrigada por estar comigo nesta caminhada em Lavras e por compor a minha banca!

Ao professor Paulo Rogério, obrigada por ter aceitado me coorientar. É muito gratificante ter a sua presença neste trabalho. Sempre me recordo de seus conselhos e ensinamentos durante o período em que tivemos contato no laboratório. Obrigada pela disponibilidade e às valiosas e imprescindíveis contribuições!

Ao professor Augusto Benevenuto, por ter acreditado em mim desde a graduação, você foi o meu primeiro contato com a área de carnes. Á você professor, toda a minha admiração. Obrigada por ter aceitado participar da banca!

À professora Simone Cunha, muito obrigada por ter aceitado participar da minha defesa. Tenho certeza de que irá contribuir ainda mais, enriquecendo o nosso trabalho.

Agradeço a todos os professores e técnicos do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), pelos ensinamentos e por todo apoio durante o meu Doutorado. Em especial, agradeço à Creuza, pela amizade e o carinho de sempre, e a Paloma, pela ajuda durante meu experimento.

Agradeço a Edinéia por sempre estar presente, com bom humor, uma boa conversa, me trazendo conforto, uma palavra amiga e muito carinho! Vou sentir saudades minha amiga!

Aos meus pais, Manoel e Tânia, obrigada por nunca medirem esforços para que os meus sonhos se tornassem realidade! Todas as minhas vitórias são dedicadas a vocês, meus maiores exemplos de vida. Amo vocês!

Ao Wiliam, agora meu “*pontinho de luz*”, este título é nosso! Palavras chegam a faltar, porque só nós sabemos o que vivemos, e o quanto você, talvez até mais que eu, gostaria de me ver “doutora”. Fui forte por você meu amor. Eu sei e sinto que continua me dando forças...agora aí de cima. Obrigada por tudo! Te amo até o céu!

Ao meu irmão José Gabriel, por todo companheirismo, amizade, cumplicidade e apoio incondicional. Obrigada por estar sempre ao meu lado e acreditar em mim às vezes mais do que eu. Te amo, “rasputio”.

Á minha vovó Lilia, a nossa querida Ionice e a todos os meus familiares, por estarem sempre presentes. Obrigada pelas orações, e por torcerem sempre pelo meu sucesso.

Aos meus pequeninos, Ana Beatriz, Cecília, Clara, Esther e João Gabriel, por tornarem os meus dias mais leves e coloridos.

Às minhas amigas “Soberanas de Botas”: Ana Beatriz, Jéssica, Karla, Larissa, Samanta e Thuany, obrigada por compreenderem meus dias de ausência, pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim e vibrarem com as minhas conquistas. Vocês são sensacionais!

Ao meu trio maravilha: Adelaide (Dedê), Ana Paula e Elídio, obrigada por toda amizade, ajuda, carinho e proteção dedicada até mim! Palavras não representam a minha gratidão! Amo muito vocês e os levarei comigo para sempre!

À toda família LabCarnes, por tornarem meus dias mais felizes, ajudando-me tanto a atingir os meus objetivos. Em especial: Angélica, Abel, Bruna, Douglas, Gabi, Jéssica, Lorena e Márcia pela contribuição neste trabalho e por serem um dos meus maiores presentes de Lavras. Muito obrigada por tudo o que vivemos juntos, sou grata pela amizade de cada um de vocês.

Á Ana Cristina por toda disponibilidade e auxílio com as análises de eletroforese, o meu muito obrigada Aninha! E a Débora Cassimiro por toda ajuda, amizade e acolhimento! Vocês são especiais!

Á todos meus amigos os meus sinceros agradecimentos pelos anos de amizade e carinho. Obrigada por todo apoio e torcida em todas as etapas de minha vida! Amo com força cada um de vocês!

Agradeço em especial a Mirian e a Jéssica, por toda ajuda nas etapas de minha vida e por nunca soltarem a minha mão! Amar vocês é pouco!

Aos professores Maurício, Vanessa e a todos os meus professores do IFsudeste – Rio Pomba, por terem acreditado em mim desde a graduação. Obrigada pelos ensinamentos e amizade.

E, a todos que direta e indiretamente fizeram parte desse trabalho e da minha vida, o meu muito obrigada! Ninguém vence sozinho, esta vitória é de cada um de vocês!

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos”.
(Provérbios 16:3)

RESUMO GERAL

A necessidade de utilização dos subprodutos cárneos, objetivou avaliar os efeitos de diferentes soluções de extração (aquosa e salina) com ou sem adição de nitrito nas etapas de recuperação proteica de coração e fígado suínos obtidos pelo método de variação do pH. Curvas da solubilidade proteica foram construídas e os pH ótimo de solubilidade (PS) e de precipitação (ponto isoelétrico; PI) definidos para ambos os subprodutos e soluções. A concentração de proteína total solúvel no PS foi maior ($P < 0,05$) no extrato do fígado do que no do coração. Adições crescentes de nitrito aumentaram ($P < 0,05$) os teores de nitrito residual (NO_2R) e favoreceu a formação da cor vermelha-rosada ao aumentar o índice de vermelho (a^*) e reduzir o ângulo de tonalidade (h), especialmente em sal. A seguir, corações de suínos (HIP), extraídos em solução aquosa (HIPaq) ou salina (HIPsal) adicionados ou não de nitrito de sódio foram secos por liofilização e caracterizados. Os tratamentos não influenciaram no teor de proteína dos isolados, mas os HIPsal apresentaram maior ($P < 0,05$) proporção de proteínas sal-solúveis e menor de proteínas insolúveis do que os HIPaq. A cor dos HIPsal era mais clara ($P < 0,05$) e menos intensa ($P < 0,05$) do que a dos HIPaq. O tratamento com nitrito reduziu ($P < 0,05$) os valores de h° , tornando as amostras mais avermelhadas. A extração salina ($P < 0,05$) reduziu a estabilidade de emulsão (EE) e o tratamento com nitrito reduziu ($P < 0,05$) a CE e a EE dos isolados. Todos os HIP continham alto teor de ferro e cálcio e todos os aminoácidos essenciais (AAE) com escores acima do requerido, exceto para valina no HIPsal. De maneira semelhante, fígados suínos (LIP), também foram extraídos em solução aquosa (LIPaq) ou salina (LIPsal) adicionados ou não de nitrito de sódio, liofilizados e caracterizados. Os LIPsal apresentaram maior teor de proteína ($P < 0,05$), além de maior proporção de proteínas sal-solúveis do que os LIPaq. A tonalidade da cor foi igual ($P > 0,05$) para todos os isolados, no entanto, a amostra LIPsal com nitrito apresentou uma cor menos intensa ($P < 0,05$) do que as demais. Os LIP apresentaram boa capacidade emulsionante (CE) e de ES, semelhantes ($P > 0,05$) às referências comerciais; ainda, o LIPsal adicionado de nitrito exibiu a melhor ($P < 0,05$) capacidade de retenção de óleo (CRO). Além disso, os LIP continham alto teor de ferro, com os LIPsal tendo maior proporção de ferro-heme. Os LIP continham todos os AAE, com escores elevados e alta eficiência proteica estimada. Desta forma, verifica-se uma alto potencial para a obtenção de isolados proteicos de subprodutos suínos e sua utilização como ingredientes tecno-funcional ou nutricional. Os HIP exibiram uma cor mais atrativa tratados com nitrito e boas propriedades nutricionais, e os LIP além de também demonstrarem ser nutricionalmente viável, como elevada concentração de ferro, apresentaram propriedades tecnológicas próximas às de proteínas do mercado.

Palavras-chave: Coração; Cor; Ferro heme; Fígado; Ingrediente proteico; Propriedades funcionais

GENERAL ABSTRACT

The need to use meat by-products provided the objective of evaluating the effects of different extraction solutions (aqueous and saline) and nitrite addition in the protein recovery steps of heart and liver porcine obtained by the pH-shifting technique. Protein solubility curves were performed and the optimal pH of solubility (PS) and precipitation (isoelectric point; PI) defined for both by-products and solutions. The concentration of total soluble protein in PS was higher ($P < 0.05$) in liver extract than in heart extract. Increasing additions of nitrite increased ($P < 0.05$) the residual nitrite content (NO_2R) and favored the formation of the pinkish-red color by increasing the red index (a^*) and reducing the shade angle (h°), especially in salt. Next, porcine hearts (HIP), extracted in aqueous solution (HIPaq) or saline (HIPsal) with or without sodium nitrite were dried by lyophilization and characterized. The treatments did not influence the protein content of the isolates, but the HIPsal showed a higher ($P < 0.05$) proportion of salt-soluble proteins and a lower proportion of insoluble proteins than the HIPaq. The color of HIPsal was lighter ($P < 0.05$) and less intense ($P < 0.05$) than that of HIPaq. Treatment with nitrite reduced ($P < 0.05$) the h values, making the samples redder. Saline extraction ($P < 0.05$) reduced the emulsion stability (EE) and nitrite treatment reduced ($P < 0.05$) the EC and EE of the isolates. All HIPs had a high content of iron and calcium and all essential amino acids (EAA) with scores above the required, except for valine in HIPsal. Similarly, porcine livers (LIP) were also extracted in aqueous solution (LIPaq) or saline (LIPsal) with or without sodium nitrite, lyophilized and characterized. LIPsals had a higher protein content ($P < 0.05$), in addition to a higher proportion of salt-soluble proteins than LIPaq. The color tone was the same ($P > 0.05$) for all isolates, however, the LIPsal sample with nitrite showed a less intense color ($P < 0.05$) than the others. The LIP showed good emulsifying capacity (EC) and ES, similar ($P > 0.05$) to commercial references; still, PLI salt added with nitrite exhibited the best ($P < 0.05$) oil holding capacity (ORC). In addition, LIP contained high iron content, with LIPsal having a higher proportion of heme iron. The LIP contained all the AAE, with high scores and high estimated protein efficiency. Thus, there is a high potential for obtaining protein isolates from by-products porcine and their use as techno-functional or nutritional ingredients. The HIP exhibited a more attractive color treated with nitrite and good nutritional properties, and the LIP, in addition to demonstrating to be nutritionally viable, with a high concentration of iron, presented technological properties close to those of proteins on the market.

Keywords: Color; Functional properties; Heart; Heme iron; Liver; Protein ingredient

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Figura 2.1 - Composição do tecido muscular.....	26
Figura 2.2 - Proteína em seu ponto isoelétrico (pI) com carga eletrostática líquida zero.....	39
Figura 2.3 - Sequência do desenvolvimento da cura em produtos cárneos.....	43

PARTE II

ARTIGO I

Figure 1. Flow chart of sequential extraction of the classic pH-shift process applied to pig byproducts.....	62
Figure 2. Protein solubility curves (mg/mL) of pigs heart (A) and liver (B) extracts obtained in aqueous and saline solution (4% NaCl; 0.05% MgCl ₂) at pH values from 1 to 12. Bars represent the standard error of the mean (n = 3).....	66
Figure 3. Protein content (A) in extracts after isoelectric precipitation (pI extract) and protein precipitation yields (B) from pigs heart and liver extracted with aqueous or saline solutions (4% NaCl; 0.05 MgCl ₂). Bars represent the standard error of the mean (n = 3). Means with different letters (<i>a,b</i>) differ (P < 0.05) by Duncan's test.....	69
Figure 4. Effects of the interaction of sodium nitrite (NaNO ₂) treatment with (A) type of byproducts (pig heart and liver) and with (B) type of solution (aqueous x saline) on residual nitrite content (NO ₂ R). Bars represent the standard error of the mean (n = 3). Means with different letters (<i>a,b</i>) differ (P < 0.05) by Duncan's test.....	72

ARTIGO II

Figura 1. Perfil representativo das proteínas (separados em gel SDS-PAGE 10%) dos isolados proteicos de coração suíno obtido por diferentes soluções de extração: HIPaq e HIPaq-N = extração em solução aquosa sem e com adição de NaNO ₂ (0,2 mg/mL), respectivamente; e HIPsal e HIPsal-N = extração em solução salina (NaCl 4%, MgCl ₂ 0,05%) sem e com adição de NaNO ₂ (0,2 mg/mL), respectivamente. PM = Padrão molecular de 20 a 200 kDa.....	94
Figura 2. Fotografia dos isolados proteicos de coração suíno e proteínas de referência. HIPaq e HIPaq-N = extração em solução aquosa sem e com adição de NaNO ₂ (0,2 mg/mL), respectivamente; HIPsal e HIPsal-N = extração em solução salina (NaCl 4%, MgCl ₂ 0,05%) sem e com adição de NaNO ₂ (0,2 mg/mL), respectivamente; IPS = isolado proteico de soja; e CPS = concentrado proteico de soro de leite.....	98
Figura 3. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) nos teores dos minerais cálcio (Ca), ferro (Fe), potássio (K), sódio (Na) e fósforo (P) em isolados de coração suíno (HIP) obtidos por precipitação isoelétrica.....	105
Figura 4. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) nos escores (AAES) de aminoácidos essenciais em isolados de coração suíno (HIP) obtidos por precipitação isoelétrica.....	109

ARTIGO III

Figura 1. Fotografia dos isolados proteicos de fígado suíno e das proteínas de referência. LIPaq e LIPaq-N = extração em solução aquosa sem e com adição de NaNO ₂ (0,2 mg/mL), respectivamente; LIPsal e LIPsal-N = extração em solução salina (NaCl 4%, MgCl ₂ 0,05%) sem e com adição de NaNO ₂ (0,2 mg/mL), respectivamente; IPS = isolado proteico de soja; e CPS = concentrado proteico de soro de leite.....	134
Figura 2. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) nos teores dos minerais cálcio (Ca), ferro (Fe), potássio (K), sódio (Na) e fósforo (P) em isolados de fígado suíno (LIP) obtidos por precipitação isoeletrica.....	139
Figura 3. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) nos escores (AAES) de aminoácidos essenciais em isolados de fígado suíno (LIP) obtidos por precipitação isoeletrica.....	143

LISTA DE TABELAS

PARTE I

Tabela 2.1- Usos industriais e farmacêuticos de subprodutos cárneos.....	32
Tabela 2.2- Técnicas de revalorização de vários subprodutos cárneos.....	34

PARTE II

ARTIGO I

Table 1. Proximate composition (mean \pm standard deviation) of raw pig hearts and livers.....	64
Table 2. Effects of extract solution and sodium nitrite treatments on protein and total heme pigment (THP) contents of pig byproducts extracts at optimum pH solubility (PS extract) and after isoelectric precipitation (pI extract).....	68
Table 3. Effects of extract solution and sodium nitrite treatments on proximate composition, residual nitrite content (NO ₂ R), CIE color and yield of precipitated proteins from pig byproducts by pH-shift process.....	70

ARTIGO II

Tabela 1. Efeitos da solução de extração (aquosa e salino) e dos tratamentos (com e sem adição de nitrito) na composição (média \pm desvio padrão) de isolados de coração suíno (HIP) obtidos por precipitação isoeletrica.	91
Tabela 2. Efeitos da solução de extração (aquosa e salino) e dos tratamentos (com e sem adição de nitrito) na cor (média \pm desvio padrão) de isolados de coração suíno (HIP) obtidos por precipitação isoeletrica.....	97
Tabela 3. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) e dos tratamentos (com e sem adição de nitrito) nas propriedades funcionais (média \pm desvio padrão) de isolados de coração suíno (PHI) obtidos por precipitação isoeletrica.....	101
Tabela 4. Composição (média \pm desvio padrão) de aminoácidos de isolados de corações suíno, obtidos por precipitação isoeletrica, utilizando solução de extração aquosa (HIPaq) e salina (HIPsal), ingestão diária recomendada (IDR) ¹ para adultos, índice de aminoácidos essenciais (IAAE) e eficiência proteica (PER).....	108

ARTIGO III

Tabela 1. Efeitos da solução de extração (aquosa e salino) e dos tratamentos (com e sem adição de nitrito) na composição (média \pm desvio padrão) de isolados de fígado suíno (LIP) obtidos por precipitação isoeletrica.....	131
Tabela 2. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) e dos tratamentos (com e sem adição de nitrito) nas propriedades funcionais (média \pm desvio padrão) de isolados de fígado suíno (LIP) obtidos por precipitação isoeletrica.....	137
Tabela 3. Composição (média \pm desvio padrão) de aminoácidos de isolados de fígados suínos, obtidos por precipitação isoeletrica utilizando solução de extração aquosa (LIPaq) e salina (LIPsal), ingestão diária recomendada (IDR) ¹ para adultos, índice de aminoácidos essenciais (IAAE) e eficiência proteica (PER).....	142

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAES	Escore químico aminoácido essencial
ABIA	Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AGs	Ácidos graxos
BSE	Encefalopatia espongiforme bovina
Ca	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CE	Capacidade emulsionante
CMS	Carne mecanicamente separada
CO	Monóxido de carbono
CPS	Concentrado proteico de soro
CRA	Capacidade de retenção de água
CRO	Capacidade de retenção de óleo
DCCR	Delineamento composto central rotacional
EAA	Aminoácidos essenciais
EC	European Commission
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ferro
HIP	Isolados proteicos de coração suíno
HIPaq	Isolado proteico de coração suíno extraído em solução aquosa
HIPaq-N	Isolado proteico de coração suíno extraído em solução aquosa e adicionado de nitrito
HIPsal	Isolado proteico de coração suíno extraído em solução salina
HIPsal-N	Isolado proteico de coração suíno extraído em solução salina e adicionado de nitrito
HNO ₂	Ácido nitroso
IAAE	Índice de aminoácidos essenciais
IAE	Índice de atividade emulsificante
IDR	Ingestão diária recomendada
IEE	Índice de estabilidade da emulsão

IPS	Isolado proteico de soja
ISP	Precipitação e solubilização isoeletrica
K	Potássio
LIP	Isolados proteicos de fígado suíno
LIPaq	Isolado proteicos de fígado suíno extraído em solução aquosa (LIPaq)
LIPaq-N	Isolado proteico de fígado suíno extraído em solução aquosa e adicionado de nitrito
LIPsal	Isolado proteico de fígado suíno extraído em solução salina
LIPsal-N	Isolado proteico de fígado suíno extraído em solução salina e adicionado de nitrito
MbFe ⁺² NO	Nitrosomioglobina
MbFe ⁺³	Metamioglobina
MbFe ⁺³ NO	Nitrosometamioglobina
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Nitrito de sódio
NO ₂ R	Nitrito residual
NO ₃	Nitrato
P	Fósforo
PER	Razão de eficiência proteica
PHT	Pigmento heme total
PI	Ponto isoeletrico
PM	Peso molecular
PS	pH ótimo de solubilidade
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida ()
UNECE	Comissão Econômica das Nações Unidas
VD	Valor diário recomendado
WHO	World Health Organization
ZnPP	Zinco-protoporfirina
ΔE*	Diferença global da cor

SUMÁRIO

PARTE I	18
1 INTRODUÇÃO.....	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 Subprodutos cárneos	21
2.1.1 Composição nutricional dos subprodutos cárneos	22
2.1.2 Proteínas da carne.....	26
2.2 Geração, consumo e utilização de subprodutos cárneos	30
2.3 Subprodutos cárneos como ingredientes alimentícios	33
2.4 Métodos de extração e recuperação proteica	34
2.5 Nitrito de sódio e cor dos extratos	41
2.6 Liofilização	44
REFERÊNCIAS	48
PARTE II - ARTIGOS	56
ARTIGO I - Extraction of proteins from aqueous and salt solutions of porcine edible by-products using the ph-shifting technique.....	57
ARTIGO II - Caracterização nutricional e tecno-funcional de isolados proteicos obtidos de coração suíno	79
ARTIGO III - Caracterização de isolados proteicos obtidos de fígado suíno como ingrediente tecno-funcional ou de biofortificação em alimentos	120

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o mercado da carne suína vem crescendo progressivamente no Brasil. Segundo dados reportados pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2021, houve um crescimento da produção de suínos, alcançando cerca de 4.701 milhões de toneladas. Com este aumento, motivado pelo elevado consumo de carnes, uma grande quantidade de subprodutos comestíveis e não-comestíveis são gerados no processo de abate e que devem ser comercializados e, ou, adequadamente processados para permitir um aumento de receita ao frigorífico.

Entre os subprodutos comestíveis produzidos a partir do abate de suíno, destacam-se os “miúdos”, órgãos e as partes de animais de abate, como encéfalo, língua, coração, fígado, rins, estômago, pés, orelhas, máscara e rabo, que podem ser usados na alimentação humana. Estes subprodutos representam uma valiosa fonte de receita para a indústria da carne, constituindo cerca de 48% do peso vivo em suínos, 54 a 56% bovinos e de 5 a 6% em aves. Os órgãos, em especial, apresentam um ótimo valor nutricional, com teor de proteína similar ao da carne magra e fontes de aminoácidos indispensáveis, vitaminas e minerais.

Porém, apesar do seu ótimo valor nutricional, a comercialização de órgãos *in natura* no Brasil é relativamente baixa, restringindo-se àqueles oriundos do abate de aves, como coração, moela e fígado e de bovinos, particularmente o fígado, o que torna necessário um melhor aproveitamento e consequente geração de valor adicional à cadeia de processamento da carne suína. Nas formulações para produtos cárneos, a permissão de uso de miúdos depende do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do produto elaborado e se restringe a valores máximos de 10% de adição. Os demais miúdos, e aqueles oriundos do abate, são utilizados pela indústria para outros fins, sendo normalmente utilizados como ingrediente para produção de ração animal.

Assim, diante da busca por fontes alternativas de proteína que vem avançando nos últimos anos, e da premissa de atender aos requisitos globais, surge a necessidade de uma utilização mais eficiente dos subprodutos. Além do valor nutricional, os subprodutos possuem excelentes capacidades emulsificantes e gelificantes, sendo um forte potencial econômico para a produção de concentrados proteicos, e possível utilização como ingredientes na indústria de alimentos, visto que, na indústria de carnes, já são rotineiramente utilizados concentrados e, ou, isolados proteicos vegetais ou do soro de leite como ingredientes por possuírem características

tecnofuncionais importantes, reduzindo o custo de produção, a fim de contribuir com o rendimento e favorecer atributos como suculência e textura nos produtos.

Vários processos vêm sendo aplicados com o intuito de recuperar as proteínas de subprodutos como os órgãos e cortes de baixo valor, a fim de possíveis aplicações como análogos de carne, extensores ou como ingrediente alimentício. Dentre estes, pode-se citar a extração por precipitação e solubilização isoeletrica (ISP), que permite uma eficiente recuperação de proteína de alta qualidade nutricional e com propriedades funcionais melhorada. Além disso, juntamente a esta técnica, o uso de sais monovalentes, como o cloreto de sódio (NaCl), associado a baixas concentrações de sais divalentes, como o cloreto de magnésio (MgCl₂) ou cloreto de cálcio (CaCl₂), vem sendo utilizados; otimizando o processo de extração e influenciando diretamente no rendimento e nas propriedades tecnológicas finais dos extratos proteicos

No entanto, em processos como a ISP, uma grande quantidade de pigmentos heme (mioglobina e hemoglobina) é extraída, sendo oxidados e gerando uma coloração enegrecida nos extratos. Desta forma, uma alternativa para contornar o problema de cor seria o uso de sais de nitrito nos extratos, uma vez que estes interagem com os pigmentos heme, formando pigmentos nitrosos mais estáveis e de cor rósea atrativa, além destes já serem comumente utilizados em produtos cárneos pelas outras diversas funções importantes conferidas.

Seguindo essa abordagem, o objetivo do presente estudo foi caracterizar extratos proteicos de dois subprodutos comestíveis de suínos (coração e fígado), utilizando água e solução salina para extração, avaliando o uso de diferentes concentrações de nitrito de sódio com o propósito de melhorar e estabilizar a cor dos extratos. Logo após, os extratos foram secos por liofilização, sendo determinada a sua composição, propriedades nutricionais e tecnofuncionais para cada um dos isolados proteicos obtidos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Subprodutos cárneos

Para explorar e comercializar os diversos subprodutos de origem animal existentes, é necessário compreender a legislação, regras e regulamentos relevantes que regem o acesso à esses e aos mercados. Segundo MATAK et al. (2015), tanto a indústria quanto a literatura científica devem se referir aos materiais como ‘subprodutos’ ou ‘coprodutos’ em vez de ‘miúdos’ ou ‘resíduos’, para minimizar a visão negativa do consumidor em relação à sua utilização como produtos de valor agregado.

No Brasil, de acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), (BRASIL, 2017), subprodutos cárneos comestíveis são definidos como os órgãos e as partes de animais de abate julgados, aptos para o consumo humano pela inspeção veterinária oficial. Dentre estes subprodutos gerados no abate, destacam-se os “miúdos”, órgãos e vísceras dos animais de açougue (miolos, língua, coração, fígado, rins, rúmen e retículos), que podem ser usados na alimentação humana.

Já na Europa, segundo a norma publicada pela Comissão Econômica das Nações Unidas (UNECE), os subprodutos são definidos como “o produto animal diferente de músculos de carne vermelha ou branca, incluindo vísceras e sangue” e que estarão sujeitos aos mesmos regulamentos que a carne da carcaça, as quais são estabelecidas regras específicas de higiene. Além disso, segundo a Comissão Europeia EC (2009), após o abate deve ser assegurada uma diminuição contínua até uma temperatura final não superior a 3 °C para as miudezas e inferior a 7 °C para as carcaças, para que possam ser utilizadas. Caso os subprodutos sejam destinados ao congelamento, este deve ser realizado sem atrasos indevidos, tendo em conta o período de estabilização antes do congelamento. E, embora estes subprodutos façam parte da fração comestível de animais abatidos, para fins de rotulagem, a união europeia restringe somente como carne os músculos esqueléticos associados, assim, a presença de miudezas nos alimentos deve ser declarada na lista de ingredientes (EC, 2009; LYNCH et al., 2018b).

Três categorias de subprodutos animais são definidas pelo regulamento europeu, de acordo com o nível de risco apresentado à saúde pública e animal: A Categoria I corresponde à categoria de maior risco e inclui, por exemplo, materiais de risco específicos associados a doenças transmissíveis, tais como a encefalopatia espongiforme bovina (BSE), bem como subprodutos animais contendo resíduos de algumas substâncias específicas e contaminantes ambientais, sendo estes utilizados para queima de combustível ou geração de biodiesel; a

Categoria II ainda considerada de alto risco, inclui materiais animais, como carcaças infectadas ou contaminadas, bem como materiais declarados impróprios para consumo humano devido à presença de corpos estranhos, sendo seus produtos também usados para combustível, biodiesel, biogás ou como fertilizantes; e por fim, a Categoria III, que oferece o menor risco e é própria para consumo humano. Os órgãos e sangue de ruminantes sadios obtidos em abatedouro frigorífico enquadram-se nesta 3ª categoria (DRUMMOND et al., 2019a; TOLDRÁ et al., 2021).

Para os Estados Unidos da América (EUA), regido pelo órgão governamental Food and Drug Administration (FDA), que faz o controle dos alimentos (tanto humano como animal), as definições das categorias para os subprodutos cárneos são bem próximas àquelas da Europa. Além disso, foram estabelecidas regras para prevenir a BSE, nas quais constituem a proibição de materiais de riscos derivados de gado que podem transportar o agente (FDA, 2004; TOLDRÁ et al., 2021).

Já na Austrália e Nova Zelândia, os subprodutos comestíveis são definidos como sendo constituintes da carcaça, incluindo sangue, cérebro, coração, rim, fígado, pâncreas, baço, língua e tripa, excluindo a carne magra, o osso e a medula óssea que são classificados separadamente (MULLEN et al., 2017).

2.1.1 Composição nutricional dos subprodutos cárneos

Quanto a composição nutricional, os subprodutos apresentam teor proteico semelhante ao da carne magra (16–19%), com valores que variam de cerca de 15% para a língua e até 20% para o fígado (ANDERSON, 1988; TOLDRA, 2011). Fornecem uma fonte de proteína de boa qualidade, com todos os aminoácidos indispensáveis e dispensáveis. O conteúdo de aminoácidos indispensáveis pode variar de 38% a 49% e também estão muito próximos daqueles encontrados na carne, que é de aproximadamente 50%, com concentrações de lisina e histidina entre 7-8 e 2-3 g/100 g, respectivamente. Notável e considerada exceção é observada no fígado que, além de apresentar cerca de 20% de proteína em sua composição, mais de 50% do conteúdo total é constituído por aminoácidos indispensáveis (HONIKEL, 2011; MULLEN; ÁLVAREZ, 2016b).

Entretanto, segundo MULLEN e ÁLVAREZ (2016a), em subprodutos com alto teor de tecido conectivo, em que se destaca o colágeno, principal tipo de proteína encontrada (proporção de 93% da proteína total para a pele, 88% nos vasos sanguíneos e 71% nas orelhas), uma grande quantidade de prolina, hidroxiprolina e glicina é apresentada em sua

composição. Devido a isto, o perfil de aminoácidos das proteínas do colágeno, em particular, tendem a ser fontes pobres de certos aminoácidos indispensáveis, como histidina, tirosina, metionina e cisteína.

Em relação aos ácidos graxos (AGs), as suas proporções variam de acordo com a espécie, dieta, idade e sexo (BRAGAGNOLO, 2011) tanto para a carne quanto para seus subprodutos. Em termos gerais, o ácido oleico é o mais abundante em cordeiros, bovinos e suínos (20-47%), enquanto em aves o mais abundante é o ácido palmítico (26%). Para o carboidrato, com exceção do fígado, onde na forma de glicogênio representam cerca de 8,5% (carne bovina) e 15% (frango), o teor de carboidratos geralmente é inferior a 1%, sendo os mesmos teores encontrados para cortes de carne (HONIKEL, 2011; MULLEN; ÁLVAREZ, 2016b).

Juntamente com a proteína, aminoácidos indispensáveis e ácidos graxos, o interesse nutricional nos subprodutos cárneos está no perfil mineral e vitamínico. Embora muitas vezes possam ser considerados como um produto de baixo valor nutricional, estes podem conter um maior teor vitamínico e mineral que a carne magra (MONTERO CASTILLO et al., 2015; MULLEN et al., 2015a).

As vitaminas são um grupo de compostos orgânicos que são essenciais para o funcionamento normal do metabolismo no corpo, atuando como cofatores ou coenzimas, e podem ser divididas em dois grupos principais, dependendo de sua solubilidade: aquelas solúveis em solventes orgânicos gordurosos e aquelas solúveis em água, sendo conhecidas como vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis, respectivamente. As vitaminas A, D, E e K formam o grupo lipossolúvel e podem ser classificadas como altas, ricas ou excelentes quando seu conteúdo em 100 g é superior a 20% do valor diário recomendado (VD) (NOLLET; TOLDRA, 2011).

Entre as vitaminas lipossolúveis, a mais abundante é a vitamina A, possuindo o fígado e rim as maiores quantidades (TOLDRÁ et al., 2012). Cem gramas de fígado podem fornecer 781% (carne de vitela), 492% (cordeiro), 433% (carne de suíno) ou 338% (carne bovina) de VD, enquanto a mesma quantidade de rim fornece 28% (carne bovina), 6,3% (vitela), 6% (cordeiro) e 4% (carne de suíno). As outras três vitaminas lipossolúveis estão ausentes ou presentes em quantidades muito baixas (NOLLET; TOLDRA, 2011; MULLEN; ÁLVAREZ, 2016b).

As vitaminas hidrossolúveis mais encontradas são as do grupo B (tiamina ou a vitamina B₁, riboflavina ou vitamina B₂, niacina ou vitamina B₃, ácido pantotênico ou vitamina B₅, a vitamina B₆, e cobalamina ou vitamina B₁₂) juntamente com folato e vitamina C, porém estas

têm baixa estabilidade, podendo ser detectada uma perda após o cozimento, dependendo do tempo e temperatura empregados. Cem grama de coração fornece 40% do VD da vitamina B₁, um cofator para enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos e gorduras. Fígado e rins de suíno são uma excelente fonte de vitamina B₂, a qual é cofator de enzimas do ciclo de Krebs, sendo capazes de fornecerem em cem gramas de produto mais de 100% do VD dessa vitamina. Outra vitamina encontrada em altas concentrações nos subprodutos é a B₃, cujos valores podem variar de 5,9 mg (baço de suíno) a 16,1 mg (fígado de carneiro). O fígado, dentre todos os subprodutos, também é considerado a melhor fonte de vitamina B₆, sendo a quantidade bastante semelhante à encontrada em cortes de carne (NOLLET; TOLDRA, 2011; MULLEN; ÁLVAREZ, 2016b).

Quanto ao conteúdo mineral, este é frequentemente maior nos subprodutos do que no tecido muscular. O fígado, por exemplo, é uma excelente fonte de minerais essenciais para a dieta humana, como ferro (Fe), cálcio (Ca), zinco (Zn) e selênio (Se), especialmente ferro e zinco. Além disso, com exceção da tripa, todos os subprodutos possuem uma composição mineral superior à da carne magra. (GARCÍA-LLATAS et al., 2011; MULLEN; ÁLVAREZ, 2016b; TOLDRÁ et al., 2021). E ainda, segundo DEVINE e DIKEMAN (2014), muitos destes micronutrientes são mais biodisponíveis para o corpo quando fornecidos a partir de uma fonte de carne.

A desnutrição por falta de micronutrientes tem muitos efeitos adversos na saúde humana, embora nem todos clinicamente evidentes, níveis moderados de deficiência podem ter efeitos prejudiciais graves na função humana (LINDSAY, 2006). Em todo o mundo, as três formas mais comuns de desnutrição de micronutrientes são deficiência de ferro, vitamina A e iodo. Dentre essas, a deficiência de ferro ainda é o distúrbio nutricional mais comum e disseminado, sendo a única deficiência de nutrientes que também é significativamente prevalente em países em desenvolvimento e desenvolvido (BLANCO-ROJO; VAQUERO, 2019; SPINELLI et al., 2019). A Organização Mundial da Saúde (OMS) calcula que quase dois bilhões de pessoas em todo o mundo apresentam anemia e que 27% a 50% da população seja afetada pela deficiência de ferro (WHO, 2017).

Anemia é a condição na qual a concentração sanguínea de hemoglobina se encontra abaixo dos valores esperados, tornando-se insuficiente para atender as necessidades fisiológicas exigidas de acordo com idade, sexo, gestação e estado nutricional. De origem multifatorial, pode ser ocasionada pela deficiência de ferro e/ou diversos outros micronutrientes, por perdas sanguíneas, processos infecciosos e patológicos concomitantes e uso de medicações específicas que impeçam ou prejudiquem a absorção do ferro. No entanto, a principal causa de anemia é a

deficiência de ferro na dieta (anemia ferropriva), estando associada a mais de 60% dos casos em todo o mundo (LINDSAY, 2006; WHO, 2017)

O ferro heme é um mineral presente no grupo prostético heme das proteínas hemoglobina e mioglobina, com mais biodisponibilidade do que o ferro não-heme encontrado em vegetais. O ferro não-heme tem uma taxa de absorção muito baixa (1 a 10%) comparado à taxa de absorção de ferro heme (15 a 35%), podendo ser ainda aumentada quando da sua ingestão com vitamina C ou o próprio ferro heme (fator carne). Pelo seu melhor aproveitamento na dieta, o ferro heme é fundamental para combater e prevenir a anemia ferropriva, comum em crianças, gestantes sem acompanhamento adequado de pré-natal e mulheres em idade fértil (LÓPEZ; MARTOS, 2004; GOMIDE, et al., 2013; GALANAKIS, 2018), o que torna os subprodutos, assim como a carne, fontes deste micronutriente altamente biodisponível.

De maneira similar ao ferro, existe uma preocupação com a baixa ingestão de cálcio (Ca), onde nem sempre são fáceis de serem atendidas as exigências diárias quando há ausência de ingestão de produtos lácteos (PALACIOS et al., 2021). No entanto, o cálcio também pode ser encontrado em subprodutos cárneos, com teores médios que variam de 30 mg/kg a 100 mg/kg, dependendo da espécie animal (SHELEF, 1975; ZOUARI et al., 2011a; DEVINE; DIKEMAN, 2014).

A ausência de cálcio na dieta contribui para o raquitismo nutricional/osteomalácia, osteoporose, osteopenia e hipocalcemia em crianças/adultos, além de aumentar o risco de vários problemas de saúde, como em gestantes e idosos (HEANEY, 2000; PALACIOS et al., 2021). Segundo a World Health Organization (WHO) e FAO (2004), as recomendações variam muito de acordo com a idade, sexo e fases da vida (gravidez e lactação). Para lactente, a recomendação varia de 300 a 400 mg/dia de cálcio, 1.300 mg/dia em crianças de 9 a 18 anos e idosos e 1.000 mg/dia de cálcio adultos até 65 anos. No entanto, a WHO e FAO (2004) também reconhecem situações especiais em que a suplementação de cálcio ou níveis mais elevados podem ser necessários.

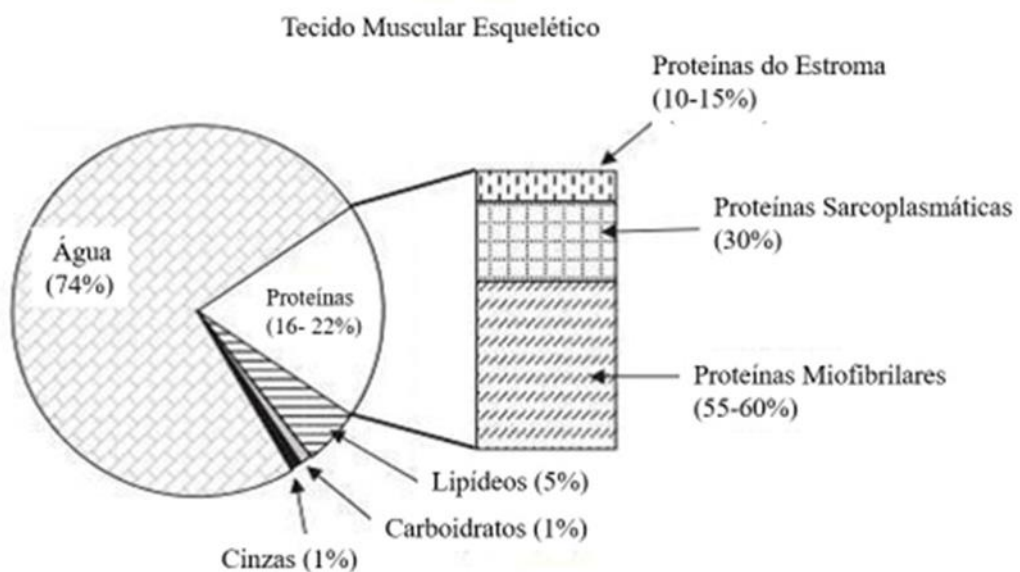
Além destes minerais, outros micronutrientes como cobre (Cu), fósforo (P), magnésio (Mg), sódio (Na), potássio (K) e zinco (Zn), são relatados como parte da composição dos subprodutos (ZOUARI et al., 2011b; JAYAWARDENA et al., 2019), sendo que os seus valores podem variar por diversos fatores, dentre eles alimentação, o tipo de órgão e a espécie avaliada.

2.1.2 Proteínas da carne

Proteínas são macromoléculas constituídas por uma ou mais cadeia de aminoácidos, podendo assim ser classificadas em: proteínas simples e proteínas conjugadas. As proteínas simples são formadas apenas por aminoácidos em sua composição, enquanto as proteínas conjugadas são formadas por aminoácidos (parte proteica) e outras substâncias (parte não proteica). Teoricamente, uma proteína pode se apresentar em diferentes graus de estruturação: primária, secundária, terciária e quaternária, sendo mantidas por vários tipos de ligação e/ou interações entre os grupos funcionais dos aminoácidos que as compõem (FENNEMA et al., 2017).

Para a carne e alguns de seus subprodutos, as proteínas representam a maior parte da sua matéria orgânica, constituindo cerca de 16-22 % do tecido muscular esquelético, conforme representado na Figura 2.1, sendo compostas por mais de 20 aminoácidos unidos por meio de ligação peptídica. Elas podem ser agrupadas de acordo com sua solubilidade: solúveis em solução salina (miofibrilares), solúveis em água (sarcoplasmáticas) e solúveis em soluções ácidas e básicas (estromais). Além disso, as proteínas exercem papéis específicos e importantes para o músculo, como função contrátil, metabólica e de suporte e estrutura (DEVINE; DIKEMAN, 2014; RAMOS; GOMIDE, 2017)

Figura 2.1 - Composição do tecido muscular.



Fonte: Adaptada de DEVINE e DIKEMAN (2014).

As proteínas miofibrilares compõem a miofibrila, organela típica da fibra muscular, e conferem ao músculo rigidez estrutural e propriedade contrátil, integrando os miofilamentos finos e grossos. De forma geral, as miofibrilas são constituídas de proteínas contráteis (actina e miosina), reguladoras da contração (tropomiosina e troponina) e citoesqueléticas (actininas, proteína M, proteína C, nebulina, desmina e titina), responsáveis pela estrutura e organização espacial da organela. Essas proteínas representam cerca de 55 a 60% das proteínas musculares e são solúveis em solução salina de força iônica entre 0,4 e 1,5 M (baixa concentração salina). Além disso, sua solubilidade em água é inferior às proteínas sarcoplasmáticas, mas superior às proteínas do estroma. A grande importância tecnológica associada às proteínas miofibrilares deve-se ao fato de que são responsáveis por uma participação de aproximadamente 50% da maciez, 75% da capacidade emulsionante (CE) e 97% da capacidade de retenção de água (CRA) da carne e seus produtos. No entanto, dentre todas do grupo, a actina e miosina se destacam, pois, juntas representam cerca de 75 a 80% das proteínas miofibrilares (LAWRIE, 2005; GOMIDE et al., 2013).

A actina é a principal proteína constituinte dos miofilamentos finos, possuindo em soluções de baixa força iônica na forma de um monômero chamado actina G, com uma forma globular (rica em aminoácido prolina) e com diâmetro de 5,5 nm. Representa cerca de 20 a 25% das proteínas miofibrilares, com um ponto isoelétrico (PI) de 4,7 e peso molecular (PM) de 47 kDa. À medida que a força iônica aumenta, até o nível fisiológico, a actina G polimeriza-se em uma forma fibrosa chamada actina F. Quando em solução salina, ela irá apresentar menor CE que a da miosina e, na ausência de sal, apresenta CE maior (LAWRIE, 2005).

Já a miosina, compõe os miofilamentos grossos, sendo dispostas paralelamente cerca de 200 a 400 moléculas para um miofilamento. Apresenta uma forma filamentosa (fibrosa), sendo, portanto, pobre em prolina. Compreende cerca de 50-55% das proteínas miofibrilares, rica em aminoácidos ácidos e básicos e altamente carregada. Possui um PI de 5,4 e PM de 470 a 500 kDa, e uma estrutura alongada (cerca de 140 a 160 nm de comprimento) em forma de vaso com uma região globular de dupla cabeça. Além disso, a molécula de miosina pode ser dividida em três partes: cabeça, pescoço e cauda, o que lhe permite atuar efetivamente no processo de contração muscular. A extremidade contendo a região globular (cabeça), e que também engloba o pescoço, é denominada meromiosina pesada (HMM), enquanto a cauda é referida como meromiosina leve (LMM). A LMM constitui a maior parte do bastão em α -hélice da molécula de miosina (PRICE; SCHWEIGERT, 1994; LAWRIE, 2005).

As proteínas sarcoplasmáticas, por sua vez, encontram-se no sarcoplasma, matriz onde estão suspensas gotículas de gordura, grânulos de glicogênio e organelas, além de pigmentos,

enzimas e nutrientes do músculo. Representando um grupo que corresponde a cerca de 30% das proteínas do músculo, as sarcoplasmáticas constituem pigmentos de cor, como a mioglobina (Mb) e hemoglobina (Hb), além de muitas enzimas que integram o sistema responsável pelo metabolismo celular (creatina quinase e enzimas glicolíticas). As principais proteínas desse grupo são as albuminas, solúveis em água, e as globulinas, extraíveis em soluções salinas de força iônica muito baixa (menor que 0,2 M) (JOO et al., 1999; GOMIDE et al., 2013). A principal contribuição das proteínas sarcoplasmáticas é na formação da cor da carne e sua transformação durante o armazenamento e processamento, visto que a cor da carne é oriunda da concentração e da natureza química de suas hemoproteínas, especialmente dos pigmentos de mioglobina e, em menor importância, da hemoglobina e citocromos (GOMIDE et al., 2013; RAMOS; GOMIDE, 2017).

A hemoglobina representa cerca de 90% da cor do músculo em animais vivos, enquanto 10% correspondem à mioglobina. No entanto, quando ocorre a sangria, este papel é invertido, isto é, em animais bem sangrados, a hemoglobina é removida, e a mioglobina passa a ser responsável por 90% ou mais da pigmentação da carne. Porém, cabe também ressaltar que, em órgãos vitais como coração, fígado e rins, por a sangria ser parcial, o principal pigmento de cor ainda continuará sendo a hemoglobina (GOMIDE et al., 2013; DEVINE; DIKEMAN, 2014).

Ademais, tanto a hemoglobina quanto a mioglobina são proteínas globulares hidrossolúveis que possuem afinidade pela molécula de oxigênio. A hemoglobina possui como função o transporte de oxigênio para a célula enquanto a mioglobina liga e estoca este oxigênio. Porém, a afinidade da mioglobina pelo oxigênio é maior do que a da hemoglobina. Desta forma, as reações com o oxigênio, bem como outros ligantes, podem resultar em mudanças (positivas ou negativas) na cor da carne e, conseqüentemente, de seus subprodutos (JOO et al., 1999; HUGHES et al., 2014).

Por fim, têm-se as proteínas do estroma, que compreendem cerca de 10 a 15% das proteínas do músculo, sendo insolúveis em água e sal, mas solúveis em soluções ácidas e básicas. Distribuídas através do corpo, como componente do esqueleto, órgãos, vasos linfáticos e sanguíneos, tendões, fibras musculares e nervosas, as proteínas do estroma fornecem estruturação aos tecidos em que se encontram e, sob calor, se gelatinizam. Esta fração proteica muscular contém como suas principais proteínas as do tecido conectivo: colágeno, elastina e reticulina, sendo as duas primeiras representantes da maior concentração de proteínas do estroma (DIKEMAN; DEVINE, 2014).

O colágeno forma o principal tipo de fibra extracelular. Compreende 5% das proteínas musculares, sendo a mais abundante no organismo do animal (20 a 25% do total de proteínas).

Está presente em grande quantidade nos tendões e ligamentos, existindo fibras de colágeno em todos os tecidos e órgãos, incluindo nos músculos, onde sua distribuição não é uniforme e possui relação com a atividade física (HOPKINS et al., 2013). Constituinte da rede proteica (endomísio, perimísio e epimísio), o colágeno é responsável pela estruturação e suporte muscular, e fornece, ainda, a matriz sobre a qual ocorre a calcificação nos dentes, cartilagens e ossos. A molécula de colágeno é uma glicoproteína, que contém pequenas quantidades de açúcares (glicose e galactose) e apresenta um PM de 300 kDa. A glicina (Gly) representa cerca de 1/3 do conteúdo total de aminoácidos do colágeno e a prolina (Pro) e hidroxiprolina (HyPro) outro 1/3. Além disso, a hidroxiprolina não aparece em quantidades significativas em outras proteínas com uma porcentagem constante de aproximadamente 14% no colágeno, sendo, portanto, utilizada para a sua determinação nos tecidos (PRICE; SCHWEIGERT, 1994; GOMIDE et al., 2013).

As fibras de colágeno são relativamente inextensíveis e individualmente são incolores, porém quando formam agregados possuem uma cor branca, que caracteriza os tendões. Estas fibras formam uma malha de rede, apresentando ligações cruzadas entre si, o que se relaciona com sua relativa insolubilidade e resistência à tensão e ao calor. São compostas por monômeros de tropocolágeno (fibrilas de 280 nm de comprimento), que são moléculas compostas por três cadeias de polipeptídeos que apresentam uma sequência estrutural básica (Gly-x-HyPro ou Gly-xPro), denominada cadeia α , e que formam uma estrutura de triplice-hélice estabilizada por ligações de hidrogênio (PARDI et al., 2007; GOMIDE et al., 2013).

Já as fibras de elastina, outra proteína do estroma, estão presentes nos ligamentos, paredes de artérias e nos músculos. Distendem-se com facilidade, e quando a tensão deixa de existir voltam ao seu comprimento normal. Embora constituam apenas 5% do total de tecido conectivo, a sua contribuição na dureza da carne é significativa. A elastina é constituída principalmente pelos aminoácidos glicina e prolina. De cor amarelada, a sua alta insolubilidade deve-se, principalmente, ao seu grande conteúdo de aminoácidos. Semelhante à elastina, a reticulina possui cor amarelada e, por ser pouco solúvel e hidrolisável, apresenta baixa digestibilidade. As fibras reticulares persistem sob a forma de delicadas redes que circundam células e dão suporte ao epitélio dos vasos sanguíneos, estruturas neurais e a membrana da fibra muscular. E, ainda, elas constituem o tecido fibroso de apoio dos órgãos (LAWRIE, 2005; PARDI et al., 2007).

Em relação às proteínas e, conseqüentemente, às suas propriedades funcionais, a solubilidade é a mais comprometida e afetada por uma série de fatores. Um exemplo são valores de pH acima e abaixo do ponto isoelétrico (pH 3,5-6,5), onde há o favorecimento de mais

interação da água com as cargas proteicas. As cargas líquidas e a repulsão de carga contribuem para uma maior solubilidade das proteínas e exposição de grupos mais hidrofóbicos. O desdobramento (desnaturação) em valores baixos ou altos de pH ocorre devido a uma diminuição nas ligações eletrostáticas (SGARBIERI, 1996b).

A temperatura é outro fator que afeta a solubilidade proteica. Segundo RAMOS e GOMIDE (2017), condições entre 40 e 45 °C tornam-se ideais para a solubilização de proteínas principais, e a sua desnaturação ocorre quando valores mais elevados de temperatura são alcançados. Conseqüentemente, este processo é sempre acompanhado pela redução de suas alterações no perfil de funcionalidade proteica, sendo, então, de extrema importância a sua consideração.

Desta forma, é muito importante o conhecimento da estrutura e das reações químicas e bioquímicas que envolvem as proteínas, pois estarão diretamente relacionadas com os atributos físico-químicos, tecnológicos e sensoriais, tais como capacidade de retenção de água (CRA), cor e textura da carne e, bem como dos seus subprodutos, objeto neste estudo. Na indústria de alimentos, as proteínas cárneas, especialmente as miofibrilares, apresentam propriedades tecno-funcionais que podem contribuir para a qualidade final do produto, incluindo gelificação, capacidade de retenção de água e emulsificação, as quais afetam diretamente a qualidade e a aceitação do produto final. Além disso, as propriedades funcionais das proteínas podem ser influenciadas pela espécie e idade do animal e pelos parâmetros de processamento durante a sua extração, como pH e força iônica (GOMIDE et al., 2013).

2.2 Geração, consumo e utilização de subprodutos cárneos

Atualmente, o consumo de proteína animal mundial representa cerca de 40% do consumo total, e há uma perspectiva de que este cenário continue a aumentar nos próximos anos (SANS; COMBRIS, 2015; LYNCH et al., 2018c; TOLDRÁ et al., 2021). Segundo dados da FAO (2018), a população global deve chegar a 10 bilhões em 2050, sugerindo a necessidade de um aumento em quase 70% na produção/fornecimento de proteína para alimentação humana.

Em especial, o consumo da carne e outros produtos processados de suínos vem aumentando. A produção de carne suína no Brasil entre os anos de 2010 e 2021 aumentou de 3,2 para 4,7 milhões de toneladas, sendo 75,8% desta produção vendida no mercado interno (ABPA, 2022). Assim, embora o consumo de carne suína (16,7 kg / per capita em 2021) seja alto no Brasil, poucos subprodutos são usados para consumo direto, sendo a maior parte da

produção destinada à alimentação animal, produtos farmacêuticos ou cosméticos, fertilizantes ou adição em produtos processados (DA COSTA et al., 2019).

Além disso, este crescimento na produção de carnes ocasiona um aumento concomitante nas quantidades de subprodutos gerados no processo de abate, tornando necessário a busca por práticas sustentáveis em sistemas de produção de alimentos presentes no setor da indústria de carnes, além de se destacar a necessidade de maior eficiência, processamento otimizado e recuperação de valor dos subprodutos gerados (MULLEN et al., 2017; TOLDRA et al., 2021).

Os subprodutos comestíveis correspondem a uma valiosa fonte de receita na indústria cárnea (LIU, 2002; LYNCH et al., 2018c), são ricos em nutrientes, (MULLEN; ÁLVAREZ, 2016b) e representam cerca de 48% do peso vivo em suínos, 54 a 56% em bovinos e de 5 a 6% em aves (MARTI et al., 2011; MULLEN et al., 2017). Dentre estes subprodutos, pode-se citar o fígado, pulmão, coração, língua, rim, cérebro, baço, sangue, cauda, orelhas e carne mecanicamente recuperada como sendo os subprodutos comestíveis mais típicos (NOLLET; TOLDRA, 2011). No entanto, o seu consumo possui grandes variações no mundo, de modo que cada tipo é apreciado em certas áreas (OCKERMAN; BASU, 2014). Na maioria dos casos, tradições, cultura e poder aquisitivo são os responsáveis pela preferência de certos subprodutos em uma determinada área ou país (NOLLET; TOLDRA, 2011).

Embora os padrões de consumo variem dependendo de fatores como cultura, tradição e necessidade, algumas tendências gerais podem ser observadas. Nos países europeus, o fígado bovino é muito apreciado pelo seu alto valor nutricional conhecido pela cultura; o coração bovino é usado na gastronomia tradicional no Peru; enquanto no Brasil os corações de frango são geralmente assados ou grelhados. A língua de boi é muito apreciada na Rússia, Japão, países do Mediterrâneo e em alguns países da América do Sul, como o Brasil e o Uruguai. Rins de suíno, cordeiro ou carne bovina são amplamente consumidos no Reino Unido (LYNCH et al., 2018c).

Nos países africanos, todos os subprodutos comestíveis são processados e consumidos como alimento humano. Por exemplo, na África do Sul, iguarias de subprodutos são pratos tradicionais. Na Angola, as miudezas são aceitas e consumidas por pessoas de todas as idades (ALAO et al., 2017). No Japão, miudezas de animais de grande porte são pouco utilizadas por motivos religiosos, enquanto miudezas de frango são amplamente usadas após grelhar. Nas Filipinas, quase todas as partes da carne suína são usadas para fins alimentares. Na Índia, Paquistão, Nepal e Bangladesh são consumidos miúdos de cabra, como pés, cabeça, testículos ou língua. No Líbano, prato feito com cérebro de cordeiro é popular (NOLLET; TOLDRA, 2011; LYNCH et al., 2018c).

Além disso, todos estes subprodutos também podem ser usados como ingredientes para outros alimentos como salsichas, sopas, guisados, pratos de legumes, ou molhos, melhorando o valor nutricional e deixando o prato mais saboroso (OCKERMAN et al., 2017). Por exemplo, a maioria destes ingredientes são usados em sopas e caldos, enquanto sangue, estômagos, língua, cabeça e intestinos podem ser usados como tripas ou ingredientes no processamento de salsichas (CHOI et al., 2016). O fígado pode ser utilizado para produção de patê, e o sangue é usado como ingrediente para a produção de chouriço, linguiça de sangue ou tofu sanguíneo (BAH et al., 2013).

Como representado na Tabela 2.1, além de seus usos culinários e nutricionais citados, os subprodutos cárneos também têm sido utilizados em uma variedade de campos, no que se destaca a alimentação para animais (MULLEN 2017), mas também vem sendo utilizados para a fabricação de adesivos para móveis (PEARSON, 2003), usos médicos (PEARL, 2005; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011) e, conforme estudos recentes, aplicação até para biofloculantes (PIAZZA; GARCIA, 2010; ZHANG et al., 2017).

Tabela 2.1 - Usos industriais e farmacêuticos de subprodutos cárneos.

Subprodutos	Aplicação
Estômago	Ração para animais de estimação (<i>Pet food</i>), cola, enzimas digestivas (pepsina, renina, lipase, tripsina).
Intestinos	Tripa para embutidos cárneos, mucosa utilizada para a produção de heparina. Suturas cirúrgicas internas, submucosa do intestino delgado para uso clínico.
Ossos	<i>Pet food</i> , farinha de ossos para ração animal Cola / adesivo, fertilizante, farinha de sangue para ração animal, bioplásticos.
Sangue	Meios de cultura celular, estabilizador de vacina, diagnóstico, plasma sanguíneo, soro sanguíneo, albumina do sangue, filmes de fibrinogênio utilizados em cirurgia, tratamento da osteoartrite e infecção por inflamação, limpeza de feridas, trombina.
Pés	Produção de cola.
Rim, coração, fígado e orelhas	<i>Pet food</i> .
Pulmão	<i>Pet food</i> , Heparina
Pele	Couro, ração para animais, lã
Graxa branca	Sabão, lubrificantes, tintas, emulsificantes, shampoo, tinta, cola, solventes
Colágeno	Cosméticos, gelatina

Fonte: LYNCH et al. (2017); DRUMMOND et al. (2019b).

Vale ressaltar que esses subprodutos, independentemente do destino de processamento, devem ser sempre conservados adequadamente, pois são altamente propensos à contaminação microbiana, de modo que esta seja uma das justificativas ao seu consumo restrito: sua grande dificuldade de conservação, além de limitada informação científica sobre sua composição nutricional e tecnológica (OCKERMAN; BASU, 2014).

2.3 Subprodutos cárneos como ingredientes alimentícios

A demanda da capacidade de produção e processamento da indústria da carne, nas últimas décadas, vem sendo impulsionada não apenas pelo crescimento, mas também por mudanças sociais e econômicas em muitos países em desenvolvimento, o que leva a busca por alternativas de aproveitamento dos subprodutos gerados no abate (TOLDRÁ et al., 2012; TOLDRÁ et al., 2016).

Além disso, os avanços na compreensão do papel da nutrição e alimentação na luta contra as doenças, bem como na promoção de um estilo de vida saudável, têm apontado para os benefícios de uma dieta rica em proteína, para controle de peso, conversão de energia muscular e envelhecimento saudável, no que se destacam as proteínas cárneas e as suas propriedades funcionais, sendo de interesse para novas formulações de alimentos (GALANAKIS, 2012; ÁLVAREZ et al., 2018). Além do valor nutricional (JAYAWARDENA et al., 2019; RESHAN JAYAWARDENA et al., 2022), os subprodutos podem apresentar excelentes funções tecnológicas como atuar na capacidade emulsificante e gelificante (LÓPEZ, M. A. A.; MARTOS, F. C., 2004; TOLDRÁ et al., 2016; PARÉS et al., 2020; TOLDRÁ et al., 2020), e são capazes de realçar o sabor dos alimentos e assim contribuir para melhorar a qualidade sensorial (ZHANG et al., 2010; IWANIYAK et al., 2016; TOLDRÁ et al., 2016).

No entanto, aplicações industriais e produtos comerciais utilizando proteínas extraídas de subprodutos do processamento de carne são até agora limitados. A grande parte estudada é sobre a extração de proteínas de subprodutos ou derivados de vegetais (arroz, soja, batatas, trigo, frutas e milho), laticínios (soro de leite), ou fontes marinhas (peixes, algas marinhas, ou frutos do mar), e também são as principais fontes de proteínas não cárneas aplicadas nas formulações de produtos. Contudo, nada impede que essas técnicas sejam transferidas ou adaptadas a materiais da indústria cárnea (COSTA et al., 2019; DRUMMOND et al., 2019a).

Apesar do seu ótimo valor nutricional, a comercialização de subprodutos cárneos *in natura* no Brasil é relativamente baixa, restringindo-se àqueles oriundos do abate de aves,

comocoração, moela e fígado e de bovinos, particularmente o fígado, sendo os demais utilizados pela indústria na elaboração de produtos derivados ou para outros fins como citado anteriormente. Vale ressaltar que, para o processamento de produtos cárneos, a sua permissão de uso depende do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do produto elaborado e se restringe a valores máximos de 10% de adição (DA COSTA et al., 2019).

Assim, diante do exposto, destaca-se o potencial econômico que os subprodutos cárneos apresentam para serem utilizados na geração de novos ingredientes na indústria de alimentos ou auxiliares tecnológicos (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Técnicas de revalorização de vários subprodutos cárneos.

Subprodutos	Técnicas de revalorização	Produtos de alto valor agregado
Fígado	Hidrólise enzimática	Peptídeos Antioxidantes
Coração	Solubilização/precipitação isoeletrica.	Proteína de alto valor com baixo teor de cinzas, gordura e colesterol.
	Lavagem de tampão fosfato.	Concentrado miofibrilar como texturizante.
Pele	Hidrólise enzimática e purificação cromatográfica	Tecidos de bioengenharia.
	Hidrólise de colágeno	Atividade antioxidante, propriedades antimicrobianas
Sangue	Hidrólise enzimática	Peptídeos antioxidantes, antibacterianos, anti-hipertensivos ou ligantes de ferro.
	Hidrólise química	Peptídeos pré-digeridos para alimentos de animais de estimação.
	Precipitação etanólica	Proteínas purificadas como ingrediente alimentar.
	Tratamento de alta pressão	Produção de aminoácidos e peptídeos.
Pulmão	Hidrólise subcrítica da água	
	Solubilização/precipitação isoeletrica e filtração por membranas	Concentrados de proteína com boas propriedades funcionais.
Penas e cabelos	Fermentação de bactérias e hidrólise enzimática	Produção de protease, meio de cultura, avaliação do solo, membranas de separação.

Fonte: MULLEN et al. (2015b; 2017).

2.4 Métodos de extração e recuperação proteica

Diante da busca por fontes alternativas de proteína, que vem avançando nos últimos anos (TOLDRÁ et al., 2021), e da premissa de atender aos requisitos globais, surge a necessidade da utilização dos subprodutos da indústria da carne para aumentar o acesso da

população mundial às proteínas. Na indústria de carnes, já são comumente utilizados concentrados e, ou, isolados proteicos vegetais ou do soro de leite como ingredientes, por possuírem características tecno-funcionais importantes, reduzindo o custo de produção, contribuindo com o aumento do rendimento e favorecendo atributos como suculência e textura nos produtos (ASSIS et al., 2010; APA, 2017). Assim, uma oportunidade de valorização dos fluxos de processamento secundário da carne consiste na obtenção de concentrados ou isolados proteicos de subprodutos cárneos, fornecendo uma abordagem alternativa para a produção, comercialização e agregação de valor no processo (COSTA et al., 2019; MORA et al., 2019).

Vários processos vêm sendo aplicados com o intuito de recuperar as proteínas de subprodutos como os órgãos e cortes de baixo valor, para possíveis aplicações como análogos de carne, extensores ou como ingrediente alimentício (LYNCH et al., 2018c). No entanto, segundo DEWITT et al. (2002), pode existir diferença na funcionalidade da proteína obtida, influenciada por diversos fatores, destacando-se entre estes o processo de extração utilizado. Desta forma, o método escolhido deverá considerar a composição do subproduto, a quantidade e disponibilidade da substância alvo para a obtenção das propriedades desejáveis (STROM-ANDERSEN, 2020), além das condições do processo, como o tempo de extração, temperatura, pH, força iônica e também a proporção de solvente de extração para amostra (DARINE et al., 2011; TOLDRÀ et al., 2019).

As principais tecnologias disponíveis baseiam-se em pré-tratamento, extração e secagem dos extratos. Em termos gerais, os pré-tratamentos podem ser definidos como qualquer processo realizado antes da extração. Esse processo visa estabilizar o material ou facilitar a etapa de extração, aumentando assim o rendimento ou a eficácia do processo e podem consistir em técnicas tradicionais como, por exemplo, aquecimento, moagem, homogeneização ou a utilização de tecnologias emergentes. A seleção da tecnologia e do método mais adequado dependerá da matéria-prima, mas, também, em particular, dos compostos alvos a serem obtidos, bem como da sua funcionalidade e aplicação desejada (MORA et al., 2019).

Dentre os principais métodos encontrados para extração proteica em subprodutos da carne, pode-se citar a hidrólise (química, enzimática, ou usando água subcrítica) (DI BERNARDINI et al., 2011; MARCET et al., 2016; LAFARGA; HAYES, 2017; MALUF et al., 2020), técnicas de lavagens sucessivas (*surimi-like*) (PARK et al., 1996; DESMOND; KENNY, 1998; MASSINGUE et al., 2019; VILLALOBOS-DELGADO et al., 2020; TOLDRÀ et al., 2021), extração por solubilização com sais (NUCKLES et al., 1990; STEEN et al., 2016a; TOLDRÀ et al., 2019; PARÉS et al., 2020) e precipitação isoelétrica de proteínas (ISP)

(SELMANE et al., 2008; DARINE et al., 2010; TAHERGORABI et al., 2012; ZHAO et al., 2016; LYNCH et al., 2018a; TSERMOULA et al., 2019a).

A hidrólise (química, enzimática, ou com água subcrítica) é tipicamente empregada para a geração de hidrolisados e peptídeos ou para recuperação de aminoácidos, apresentando um bom rendimento, mas, em contrapartida, os reagentes são caros (LYNCH et al., 2018c).

DI BERNARDINI et al. (2011) extraíram por hidrólise proteínas sarcoplasmáticas de fígados bovinos, utilizando a enzima Termolisina a 37 °C por 2h. Os autores encontraram semelhanças entre a composição de aminoácidos dos hidrolisados obtidos e a capacidade antioxidante, quando comparados com outros previamente relatados. Os autores concluíram que o subproduto pode ser utilizado como matéria-prima para a geração de peptídeos bioativos com atividades antioxidantes demonstradas *in vitro*, utilizando a técnica de hidrólise enzimática.

MALUF et al. (2020) otimizaram, por meio de delineamento composto central rotacional (DCCR), diferentes condições para a hidrólise de fígados de suíno, utilizando as enzimas Alcalase 2.4L™ e Novo Pro-D™. Dentre as variáveis analisadas, os autores relataram que, em relação à aplicação industrial, a melhor condição para a extração por hidrólise enzimática em fígado suíno seria: uma relação enzima/proteína de 1,5% (p/p) e 20% (p/p) proteína/água, 62 °C, pH 6,4 por 5h e a enzima Novo Pro-D™. Esta enzima mostrou-se mais eficiente e com menor tempo de processo quando comparada à Alcalase 2.4L™.

No entanto, DRUMMOND et al. (2019a) afirmam que, para a obtenção de proteínas mais intactas e destinadas à aplicação em alimentos, devem ser obtidas utilizando outros métodos, como por exemplo, *surimi-like*, extração com sais e solubilização e precipitação isoeletrica (ISP).

Na obtenção do *surimi-like* a técnica de extração proteica é baseada no processo de lavagens para remoção de proteínas solúveis em água, enzimas, sangue e minerais, de modo a concentrar as proteínas miofibrilares. O mesmo princípio pode ser aplicado à carne bovina e suína que, devido ao seu alto conteúdo de proteínas miofibrilares, forma-se um gel muito forte e elástico após o cozimento (PARK et al., 1996; LYNCH et al., 2018b). Este método apresenta como vantagem o baixo custo de reagentes e os solventes aquosos utilizados, porém, para algumas matérias-primas apresentam um baixo rendimento (DRUMMOND et al., 2019a).

PARK et al. (1996) elaboraram *surimi-like* de carne suína e bovina. Os teores de aminoácidos aumentaram para bovino e suíno lavados em água, com valores de 6,5 e 7%, respectivamente, quando comparados com o músculo controle. Entre os 16 aminoácidos analisados, a histidina e a glicina diminuíram na carne bovina e suína lavadas com água,

enquanto, em contrapartida, outras aumentaram em relação ao músculo. O teor de gordura diminuiu com os processos de lavagem, embora a concentração de colesterol não tenha sido alterada.

MASSINGUE et al. (2019) avaliaram diferentes tipos de soluções (água, cloreto de sódio, bicarbonato de sódio e tampão fosfato de potássio) e ciclos de lavagem em carne mecanicamente separada de peru (CMS) para a produção de material *surimi-like*. Os autores concluíram que a solução de bicarbonato de sódio foi a que proporcionou um *surimi-like* com os maiores valores de pH e de capacidade de retenção de água, além de exibir a remoção mais eficiente de pigmentos heme, caracterizando um produto com a melhor qualidade tecnológica.

VILLALOBOS-DELGADO et al. (2020) elaboraram surimi com proteínas extraídas de coração suíno e bovino. Os autores analisaram a substituição da carne magra por diferentes concentrações (0, 20%, 40% e 60%) da proteína em formulações de salsicha. A adição de surimi nas amostras aumentou o teor de proteína, e a concentração de 20% diminuiu a oxidação lipídica de salsicha. Além disto, nesta concentração, o surimi de coração suíno apresentou aparência, cor e odor semelhante ao controle. De maneira semelhante, TOLDRÀ et al. (2021) recuperaram proteínas de baço suíno, por meio da técnica de obtenção do *surimi-like*, e o avaliaram como substituto da carne (0, 5%, 10% e 15%) em salsichas. Os resultados demonstraram que o surimi pode ser utilizado como substituto de carne em até 15% sem produzir nenhuma modificação significativa nas propriedades físico-químicas e tecno-funcionais (capacidade de retenção de água e textura instrumental) das salsichas avaliadas.

Outras estratégias para extração proteica é a aplicação conjunta de sais monovalentes e divalentes, como o cloreto de sódio (NaCl) (STEEN et al., 2016b; PARÉS et al., 2020), cloreto de magnésio (MgCl₂) e cloreto de cálcio (CaCl₂) (NAYAK et al., 1996; PARK et al., 2000). O principal efeito desses sais é a atuação principal sobre a solubilidade das proteínas miofibrilares, que representam cerca de 55 a 60% das proteínas musculares e são solúveis em solução salina de baixa força iônica, entre 0,4 e 1,5 M (RAMOS; GOMIDE, 2017). Desta forma, por meio da adição de sais, o rendimento dos extratos das proteínas dos subprodutos pode ser maior, pois há um aumento dos efeitos eletrostáticos, de hidratação e de estruturação da água com as proteínas miofibrilares, diante do aumento da solubilidade (*salting in*) (ARAÚJO, 2011), o que pode se tornar alternativa viável, ou, ainda, podendo atuar como coadjuvante junto à outra técnica de extração.

NAYAK et al. (1996) avaliaram a utilização de soluções de NaCl (0, 0,5, 1,0, 2,0 e 4.0%) com ou sem a adição de sais divalentes (0,05% CaCl₂ ou 0,05% MgCl₂) para extração proteica em peito de peru moído e músculo da coxa. Os autores concluíram que a combinação

do NaCl a 4% juntamente com 0,05% de MgCl₂ aumentaram a solubilidade da miosina e da actina para a coxa. Além disto, constataram também que tal resultado poderia favorecer o aumento de rendimento e textura, contribuindo para o desenvolvimento de produtos com coxa de peru. De maneira semelhante, PARK et al. (2000) utilizaram, para extração proteica de farinha de carne e ossos, as mesmas concentrações de sais definidas no estudo anterior e demonstraram que em 4% de NaCl e 0,05% de MgCl₂ as amostras apresentaram um aumento de 30% da solubilidade proteica em comparação com o controle.

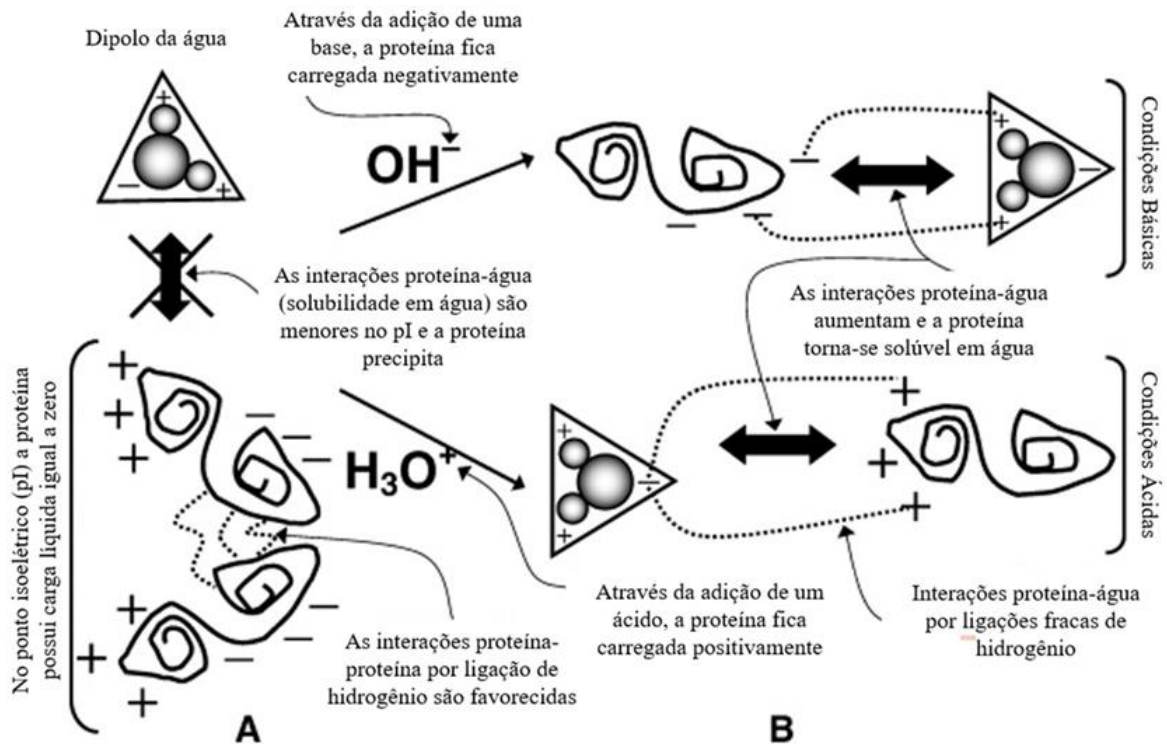
STEEN et al. (2016a) estudaram o efeito de diferentes concentrações salinas (0, 1,8 e 3,4% de NaCl) nas propriedades funcionais (emulsificação, gelificação e formação de espuma) das frações proteicas de fígado suíno, caracterizando três frações: solúvel em água, sal solúvel, e proteínas hepáticas solúveis em sal. A adição de 1,8% de NaCl aumentou as propriedades espumantes das frações solúveis em água e das hepáticas solúveis em sal, enquanto um aumento adicional de NaCl as reduziu. Os autores relataram que esta diminuição é, provavelmente, devido à reagregação da maior quantidade de grupos hidrofóbicos formados a partir de 3,4% de NaCl.

TOLDRÀ et al. (2019) avaliaram diferentes níveis de pH (4,3, 5,0, 6,5, 8,0 e 8,6) e concentrações de NaCl (0%, 0,58%, 2%, 3,42% e 4%), utilizando o método de superfície de resposta para investigar condições adequadas de extração proteica em baço suíno. Valores mais altos de solubilidade proteica, em torno de 70%, foram alcançados em condições de extração com pH médio-alto (6,5-8,6) e força iônica alta (2-4%). De maneira similar, PARÉS et al. (2020) também utilizaram a metodologia de superfície de resposta para avaliarem os efeitos de pH e NaCl em corações suínos, utilizando os mesmos fatores pré-estabelecidos no estudo anterior. Os autores concluíram que as condições que permitiram a melhor funcionalidade proteica em relação à capacidade espumante e de gelificação foram géis com pH 5 e 6,5, respectivamente, e ambos com alto teor de sal (2-4%).

No entanto, dentre as várias técnicas de recuperação de proteínas, o processo de mudança de pH é uma das alternativas mais promissoras para a extração proteica em subprodutos cárneos, apresentando um bom rendimento, com funcionalidade melhorada, além de um baixo custo (HRYNETS et al., 2011). Também conhecido como precipitação isoeletrica de proteínas (ISP), este método baseia-se no princípio de que a solubilidade de um material cominuído contendo proteína e homogeneizado em água é afetado pelo pH da mistura. Assim, durante os processos de ISP, as proteínas da carne são primeiramente solubilizadas em pH baixo ou alto (ácido ou alcalino), seguida por uma precipitação no seu ponto isoeletrico (pI), para que ocorra a separação dos lipídios neutros e de membrana e o pH adicional ajuste ao pH original

da carne, conforme representado esquematicamente na Figura 2.2 (NOLSØE; UNDELAND, 2009; TAHERGORABI et al., 2011; MATAK et al., 2015; COSTA et al., 2019).

Figura 2.2 - Proteína em seu ponto isoelétrico (pI) com carga eletrostática líquida zero.



Legenda: **A.** No pI, as interações proteína-água estão no mínimo, enquanto as interações proteína-proteína estão no máximo, causando precipitação de proteínas. **B.** Interações proteína-água acontecendo em condições ácidas ou básicas, distanciando do pI, resultando em maior solubilidade proteica.

Fonte: GEHRING, C. K. et al. (2011) adaptado.

Brevemente, após a solubilização da proteína, o extrato é submetido à centrifugação, onde ocorre a separação do material dissolvido ou sobrenadante, do não dissolvido, ou *pellet*. A precipitação proteica só ocorre quando as cargas da proteína são nulas, ou seja, quando as moléculas não possuem cargas positivas nem negativas em excesso, denominado ponto isoelétrico. Nesse ponto, a proteína apresenta a menor solubilidade, e também pode ser recuperada por centrifugação e decantação (NOLSØE; UNDELAND, 2009; GEHRING, C. et al., 2011). (SGARBIERI, 1996a). Curvas de solubilidade e ou estudos preliminares são realizados para determinação dos pontos de solubilidade e precipitação proteica.

COSTA et al. (2019) obtiveram curvas de solubilidade para diferentes subprodutos de suínos (fígado, coração e rim). Os autores relataram uma maior solubilidade da proteína em valores de pH mais altos para o fígado (5,23 mg/mL entre pH 9,0 e 12,0) e rim (3,81 mg/mL

entre 9,0 e 10,0) do que em valores de pH mais baixos (2,89 mg/mL de fígado e 3,53 mg /mL de rim, ambos em pH 2,5). Já o coração, entretanto, apresentou a maior solubilidade proteica (média de 3,42 mg/mL) tanto em valores de pH baixo (2,0) quanto alto (12,0).

LYNCH et al. (2018a) otimizaram com sucesso esta técnica para a extração proteica de pulmões (bovinos e suínos), um subproduto conhecido por seu conteúdo relativamente alto de tecido conjuntivo. Os autores utilizaram DCCR com variáveis independentes para solubilização de proteínas (tempo:10–120 min, temperatura:4–20 °C, pH :8,0–11,0), razão solvente/amostra:2,5–10) e para precipitação (tempo:0-60 min e pH: 4,25-6,00), com o objetivo de identificar as melhores condições de processamento, bem como quaisquer interações significativas. As condições ideais para a solubilidade máxima da proteína foram de um tempo de extração de 140 min, temperatura 19 °C, pH 10,8 e razão solvente/amostra 13,02 e para precipitação máxima de proteína foi em pH 5,03 e 60 min. Desta forma, estudos ou testes preliminares podem favorecer e auxiliar na aplicação da técnica. Além disto, vários trabalhos vem abordando o método de ISP em fontes de proteína animal, que não peixe, com sucesso do ponto de vista tecnológico e nutricional, em subprodutos bovinos (DEWITT et al., 2002; DARINE et al., 2010; LYNCH et al., 2018a), suínos (TSERMOULA et al., 2019b; TOLDRÀ et al., 2021) e de aves (TAHERGORABI et al., 2011; TAHERGORABI et al., 2012; KHIARI et al., 2014; ZHAO et al., 2016).

DARINE et al. (2010) utilizaram solubilização alcalina (pH 9,0) seguida de precipitação para extração de proteínas (pH 4,0) em pulmões bovinos para posterior purificação e obtenção de concentrados proteicos. O rendimento total da extração foi de 40%, valor semelhante ao encontrado por SELMANE et al. (2008), que também empregaram solubilização alcalina para extração de proteínas de pulmões bovinos e suínos e carne mecanicamente separada (CMS). Ambos os autores indicam que a precipitação de proteínas no seu ponto isoelétrico constitui em uma ferramenta adequada para recuperação proteica de pulmão bovino em escala industrial e sugerem que sejam realizados mais estudos quanto á suas propriedades tecno-funcionais.

TAHERGORABI et al. (2012) aplicaram o método de ISP (solubilização pH:11,5; precipitação pH:5,5) para recuperar proteínas de coxas de frango (com pele e com osso). As proteínas da coxa recuperadas pelo ISP foram utilizadas como ingrediente principal para desenvolver alimentos funcionais com adição de óleo rico em PUFA ω -3, fibra solúvel, cloreto de potássio, amido de batata, polifosfato e transglutaminase. Após o cozimento, os géis de sobrecoxa de frango apresentaram propriedades de cor e textura comparáveis aos géis elaborados somente de carne de peito de frango. No entanto, as propriedades de gelificação foram melhores para os géis de coxa.

ZHAO et al. (2016) aplicaram o processo de solubilização/precipitação isoeletrica (ISP) para melhorar as propriedades de gelificação da proteína de carne de peito de frango pálida, flácida e exsudativa (PSE). Primeiramente, foram avaliados diferentes valores de pH (2,5, 3,0, 3,5, 11,0, 11,5 e 12,0), para determinação dos pontos de solubilidade e precipitação proteica. Os resultados mostraram que as proteínas da carne de peito de frango PSE extraídas pelo método de ISP (pH 11,0 e pH 3,5) aumentaram significativamente ($P < 0,05$) a dureza do gel e a capacidade de retenção de água, demonstrando ter potencial para aumentar o valor econômico de carnes PSE e melhorar as propriedades de gelificação.

TSERMOULA et al. (2019a) avaliaram as técnicas de solubilização alcalina (pH 11,0) e ácida (pH 2,0), seguidas de precipitação isoeletrica (pH 5,5) para extração proteica de corações bovino e suíno e verificação das propriedades funcionais. A solubilização alcalina produziu extratos ricos em proteínas para os corações de suínos (11,31%) e bovinos (14,33%), com excelentes propriedades de gelificação e baixo teor de gordura e colesterol. Além disto, em pH alcalino, os extratos apresentaram uma cor mais avermelhada e menor perda de cozimento, o que seria um benefício econômico, sendo, então, mais favorável a sua utilização.

2.5 Nitrito de sódio e cor dos extratos

Apesar do alto potencial apresentado para a utilização de subprodutos cárneos conferidos pelas propriedades tecno-funcionais e nutricionais, a sua coloração ainda gera uma grande restrição para o uso como matéria-prima ou ingrediente na indústria de alimentos (WISMER-PEDERSEN, 1988; PEREIRA et al., 2014). Muitas vezes, os consumidores relatam os produtos como sendo menos atraentes, com uma cor enegrecida, resultante da oxidação de grande quantidade de pigmentos heme (mioglobina e hemoglobina) presentes (COSTA et al., 2019).

Sabe-se que a cor dos alimentos influencia diretamente a preferência e decisão de compra. Segundo PRICE e SCHWEIGERT (1994), os alimentos alcançam suas melhores classificações e maiores preços por meio de cores desejadas, as quais os consumidores relacionam diretamente com a qualidade da matéria-prima utilizada.

Diante do exposto, estudos e técnicas vem sendo realizadas com o objetivo de contornar a atratividade e estabilidade da cor em subprodutos cárneos. FONTES et al. (2004) e FONTES et al. (2010) demonstraram que sangue suíno saturado com monóxido de carbono (CO) produziu um pigmento com cor que poderia permitir uma maior quantidade de adição do sangue à produtos cárneos, não ocasionando o seu escurecimento. Além disso, PEREIRA et al. (2014)

incorporaram sangue suíno, também tratado com CO em formulações de mortadelas, e concluíram que os tratamentos com CO permitiram a obtenção de mortadelas mais coloridas. Os autores explicam que existe uma alta afinidade da fração CO com os pigmentos heme do sangue, mesmo conceito utilizado para a embalagens em atmosfera modificada.

Seguindo esta abordagem, a utilização de nitrito de sódio (NO_2) seria, então, outra alternativa viável. Já utilizado em formulações de produtos cárneos, este composto também interage com os pigmentos heme, formando pigmentos nitrosos mais estáveis ao calor e de cor rósea atrativa (RAMOS; GOMIDE, 2017), o que poderia auxiliar na cor de subprodutos. Ademais, não foram encontrados na literatura estudos que avaliassem a adição de nitrito simultânea a etapas de extração proteica, com o objetivo de melhorar a estabilidade da cor em subprodutos cárneos comestíveis, como os órgãos de suínos.

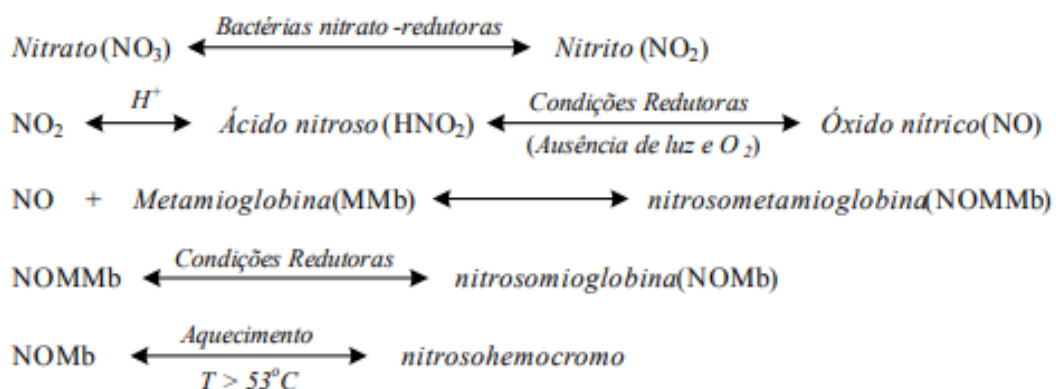
O nitrito de sódio, conhecido popularmente como sal de cura, é amplamente utilizado na indústria de carnes, sendo classificado como conservante. Ele desempenha inúmeras funções importantes e distintas em produtos cárneos, sendo empregado com o propósito de inibir o desenvolvimento de microrganismos, especialmente o *Clostridium botulinum*, além de sua função antioxidante para o controle de oxidação lipídica, formação de cor, sabor e aroma característicos em produtos cárneos curados (KO et al., 2017; SILVA et al., 2021).

Uma vez que o nitrito é um agente muito eficaz, o desenvolvimento de cor consiste, primeiramente, em uma reação inicial da conversão das formas químicas da mioglobina em metamioglobina (MbFe^{+3}), pigmento de mioglobina com o ferro heme na forma oxidada e sem ligante na sexta posição e que confere uma coloração marrom à carne (RAMOS; GOMIDE, 2017). No entanto, como representado na Figura 2.3 nas condições presentes na carne e de seus subprodutos (pH entre 5,5 e 6,0), o nitrito é convertido a ácido nitroso (HNO_2) e a óxido nítrico (NO), presentes em equilíbrio. O NO formado se combina com a porção heme da metamioglobina para originar o pigmento de nitrosometamioglobina ($\text{MbFe}^{+3}\text{NO}$), altamente instável e que é rapidamente reduzido à forma química de nitrosomioglobina ($\text{MbFe}^{+2}\text{NO}$), pigmento de cor vermelho-rosado característica de produtos curados crus. Esse processo de redução de $\text{MbFe}^{+3}\text{NO}$ a $\text{MbFe}^{+2}\text{NO}$, bem como do NO_2 a NO, é realizado por um sistema redutor (NADH, glutatona, etc.) naturalmente presente no meio ou por ácido ascórbico/eritorbato adicionados em produtos cárneos (O'KEEFFE; HOOD, 1982; MOLLER; SKIBSTED, 2002).

Embora na ausência de oxigênio o pigmento de nitrosomioglobina seja muito estável, na presença de oxigênio a estabilidade do complexo $\text{MbFe}^{+2}\text{NO}$ é altamente dependente da taxa de dissociação do NO, uma vez que o oxigênio apenas reage com o NO livre, oxidando-o

rapidamente a NO_2 . Dessa forma, o pigmento de nitrosomioglobina é considerado instável, uma vez que a concentração de oxigênio, geralmente é muito maior, substituindo o NO assim que este se dissocie da mioglobina (LIVINGSTON; BROWN, 1981). Além disso, outros oxidantes reagem com o NO, convertendo-o novamente a nitrato (NO_3), que deverá ser convertido a nitrito (NO_2), que, por sua vez, precisará se transformar novamente em NO, para, então, reagir com a mioglobina, ilustrando a natureza cíclica de oxirredução das reações de cura (MOLLER; SKIBSTED, 2002)

Figura 2.3 - Sequência do desenvolvimento da cura em produtos cárneos.



Fonte: RAMOS e GOMIDE (2017).

Assim, uma forma de estabilização do complexo $\text{MbFe}^{+2}\text{NO}$ é a desnaturação da molécula de globina pelo aquecimento ($50\text{-}60^\circ\text{C}$), formando o pigmento nitrosohemocromo, que apresenta cor rósea, característica de produtos curados cozidos (RAMOS; GOMIDE, 2017). Quando a globina é desnaturada, a sua ligação com o grupo heme (sítio His F8) é rompida e substituída por outra molécula de NO ou por outro ligante nitrogenado. Essa nova ligação forma um complexo com maior estabilidade à oxidação e à dissociação do NO (LIVINGSTON; BROWN, 1981).

Entretanto, os complexos mioglobina-NO nitrosomioglobina e nitrosohemocromo são fotossensíveis, ocorrendo a dissociação do NO da molécula de mioglobina na presença da luz. Assim, se nas condições de armazenamento o produto curado for exposto à luz e ao oxigênio, o NO dissociado será rapidamente oxidado a nitrito (NO_2) e o produto apresentará uma descoloração, conhecida como *fading*. Se, no entanto, não houver oxigênio presente, o NO não é oxidado e pode recombinar com o grupamento heme (RAMOS; GOMIDE, 2017). Por isso,

produtos curados exigem embalagens apropriadas que conferem proteção à luz e ao oxigênio, sendo embalados a vácuo.

Uma vez que o nitrito interage com outros compostos na carne além da mioglobina, o teor de nitrito residual é extremamente importante no produto para exercer suas funções. Segundo RIBEIRO e SERAVALLI (2007), para a obtenção da coloração desejada em produtos cárneos a adição de 50 mg/kg de nitrito é suficiente. Porém, SINDELAR (2006) afirma que a quantidade de nitrito adicionado reduz com o decorrer do processamento e do tempo de armazenamento, devido ao fato de reagir ou se ligar aos componentes químicos da carne, permanecendo cerca de 10 a 20%, no qual é denominado de nitrito residual.

Desta maneira, vários fatores devem ser considerados quanto à utilização de nitrito em subprodutos cárneos, principalmente se este for simultâneo em etapas de extração proteica. Dentre estes, destaca-se o pH do extrato e a concentração do conservante adicionada, de modo que sejam garantidas que as reações ocorram adequadamente e que também a cor permaneça estável durante o armazenamento. Além disso, cabe ressaltar que caso os extratos ou concentrados proteicos obtidos sejam adicionados em produtos cárneos, os teores de nitrito devem ser considerados.

2.6 Liofilização

Após as etapas de extração proteica e/ou tratamentos utilizados, muitas vezes é necessário melhorar a pureza e/ou remover o excesso de água para obter um material de mais fácil manuseio (LYNCH et al., 2018c) e que apresente estabilidade, vital para a segurança e qualidade. Os alimentos em pó são historicamente estáveis em prateleiras e de fácil armazenamento e transporte. A baixa atividade de água ($< 0,4$) e o teor de umidade encontrada para estes produtos impedem a multiplicação microbiana, e, portanto, tornam os produtos em pó relativamente estáveis e com maior vida útil (LONG; MOHAN, 2021). Os produtos em pó são ingredientes multifuncionais e fáceis de serem utilizados, de modo que a sua obtenção a partir de subprodutos cárneos reduziria ainda mais o desperdício e facilitaria a busca por produtos economicamente viáveis e eficientes como ingredientes em produtos alimentícios.

GALANAKIS (2012) sugere que para proteínas, as técnicas utilizadas devem ser cautelosamente selecionadas e apropriadas, afirmando que os critérios estabelecidos até a obtenção do produto apresentarão efeito direto no produto final, bem como sua funcionalidade e valor nutritivo, além de cor e sabor desejáveis ou não (BOLAND et al., 2013).

Seguindo essa abordagem, a secagem tradicional envolve basicamente a remoção da água do material através da fase de vapor, sendo um dos métodos mais antigos de conservação de alimentos. Quando aplicada pode representar perdas significativas de nutrientes e degradação térmica de materiais sensíveis ao calor, devido à operação em altas temperaturas de entrada (BHANDARI et al., 2008; ISHWARYA et al., 2015). Assim, quando produtos altamente sensíveis à temperatura, como proteínas, precisam ser secos, uma das técnicas de secagem mais sugeridas é a liofilização, uma vez que não utiliza altas temperaturas, com o desafio de preservar os componentes lábeis ao calor, embora ainda seja um custo significativamente maior do que os processos de secagem tradicionais (MUMENTHALER; LEUENBERGER, 1991).

A liofilização é uma alternativa de secagem quando o material é composto por substâncias muito sensíveis a altas temperaturas. Neste processo, primeiramente o alimento é congelado, com formação de cristais de gelo, seguidamente aplicação de alto vácuo e de condições combinadas de temperatura, através do qual o gelo aquoso sublima (evapora diretamente, sem fusão) (BERK, 2018). Este processo de desidratação se fundamenta na remoção de água por sublimação (transição direta do estado sólido para o estado gasoso, sem derreter). Dentre as vantagens do processo de liofilização, em relação aos outros tipos de secagem, pode-se citar, principalmente, a redução da desnaturação proteica e as reações degradativas (MUJUMDAR), além da manutenção das propriedades sensoriais, tais como cor, sabor, aparência e textura (GEORGE; DATTA, 2002). Além disso, o produto liofilizado também pode ser reconstituído em água rapidamente, pois a estrutura dos poros apresenta boa permeabilidade, proporcionando um alimento semelhante ao alimento original (KROKIDA; PHILIPPOPOULOS, 2006). Quanto às reações microbiológicas, em grande parte, são paralisadas (RATTI, 2001). No entanto, cabe também destacar que, este processo só pode ser realizado em modo de lote, os tempos de secagem podem ser muito longos e com maior custo operacional (congelamento e vácuo) limitando o uso desta técnica para produtos de menor valor agregado (ISHWARYA et al., 2015)

RESHAN JAYAWARDENA et al. (2022) avaliaram diferentes temperaturas (50 °C, 70 °C e 100 °C) de secagem para a obtenção de pulmão bovino em pó, bem como os seus efeitos nas propriedades funcionais e nutricionais de um possível suplemento alimentar. Embora não tenha sido avaliado um método de secagem em si, foi constatado que, nas amostras secas a 50 °C, 41% do teor total de ferro era na forma heme, diferentemente dos 29% encontrados nas amostras quando a temperatura de secagem aumentou para 100 °C. Além disto, o pulmão em pó obtido a 50 °C apresentou propriedades funcionais comparativamente melhores em relação à estabilidade oxidativa de proteínas e de lipídios durante o armazenamento, indicando o

potencial do produto como ingrediente proteico para o desenvolvimento de suplementos alimentares. Os autores pretendem avaliar técnicas de secagem, como a liofilização, por utilizarem temperaturas menores, a fim de garantir a qualidade e propriedades funcionais desejadas para o pó.

DARINE et al. (2010) extraíram proteínas de pulmão bovino pelo método de solubilização e precipitação isoeletrica, empregando a liofilização para obtenção dos concentrados. Os autores relataram que, depois de secos, os concentrados de pulmão bovino apresentaram boas propriedades emulsificantes, com uma atividade emulsionante particularmente alta, podendo, portanto, serem utilizados como emulsificante em produtos cárneos, por apresentarem propriedades superiores àquelas do caseinato de sódio, comumente usado.

DA COSTA et al. (2019), utilizando a técnica de mudança de pH para extração proteica, também aplicaram o método de liofilização para secar extratos de subprodutos suínos (fígado, rim e coração) e obter os concentrados proteicos. Ao compará-los com proteínas comerciais de referência (CPS= concentrado proteico de soro de leite e IPS= isolado proteico de soja), todas as amostras do estudo apresentaram melhor capacidade de retenção de água. Além disso, ao realizarem a sua aplicação em massa modelo de salsicha, os autores relataram que os concentrados apresentam um grande potencial de uso como extensores na elaboração de produtos emulsionados. Sendo assim, a liofilização é uma técnica eficiente para a obtenção de ingredientes à base de proteínas, principalmente no que diz respeito à manutenção de suas características tecno-funcionais e nutricionais.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a necessidade do aumento/produção de proteína para alimentação humana, o aproveitamento de subprodutos gerados pela indústria da carne é uma opção completamente relevante. Como demonstrado neste estudo, se utilizadas técnicas adequadas para a extração proteica, como a solubilização e precipitação isoelétrica, além dos elevados teores de proteína alcançados, pode se obter produtos economicamente viáveis e eficientes para uso como ingrediente em produtos alimentícios, a fim de conferir propriedades nutricionais e tecno-funcionais.

De maneira geral, o trabalho melhorou a recuperação de proteínas em coração e fígado suínos, subprodutos de baixo consumo *in natura* no país, com a adição de sais na etapa de extração, e conseqüentemente, isolados proteicos foram obtidos com grandes quantidades de proteína além da permanência de todos os aminoácidos essenciais e ferro detectados em sua composição. E ainda, para tratar a cor, um atributo que ocasiona a não utilização destes subprodutos, a adição de nitrito foi utilizada e também demonstrou-se eficaz principalmente para o coração.

Portanto, a obtenção de isolados proteicos a partir de coração ou fígados suínos apresentaram alta viabilidade de aplicação, podendo ser utilizado como ingrediente tecno-funcional em produtos cárneos e também como suplementação ou biofortificação á dietas. Ainda, particularidades foram observadas de acordo com cada órgão, e por isto a finalidade pretendida deve ser considerada.

REFERÊNCIAS

- ABPA. **Relatório Anual 2022. Associação Brasileira de Proteína Animal.** São Paulo: p.144, 2022.
- ALAO, B. O. et al. The Potential of Animal By-Products in Food Systems: Production, Prospects and Challenges. **Sustainability**, v. 9, n. 7, p. 1089, 2017.
- ÁLVAREZ, C.; DRUMMOND, L.; MULLEN, A. M. Protein recovered from meat co-products and processing streams as pork meat replacers in Irish breakfast sausages formulations. **LWT**, v. 96, p. 679-685, 2018.
- ANDERSON, B. Composition and nutritional value of edible meat by-products. **Edible meat by-products, Advances in meat research**, v. 5, p. 15-45, 1988.
- APA. **Associação Brasileira de Proteína Animal. Proteínas do Soro de Leite Relatório Anual de 2017.** 2017.
- ARAÚJO, J. M. A. Química de Alimentos: teoria e prática. atual. ampl. **Viçosa, MG. UFV**, 2011.
- ASSIS, M. et al. **Avaliação físico-química de filés de peito de frango adicionados de sal, tripolifosfato de sódio e proteína isolada de soja**, 2010.
- BAH, C. S. et al. Slaughterhouse blood: an emerging source of bioactive compounds. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 3, p. 314-331, 2013.
- BERK, Z. Freeze drying (lyophilization) and freeze concentration. **Food process engineering and technology**, v. 2, p. 567-581, 2018.
- BHANDARI, B. R.; PATEL, K. C.; CHEN, X. D. Spray drying of food materials-process and product characteristics. **Drying technologies in food processing**, v. 4, p. 113-157, 2008.
- BLANCO-ROJO, R.; VAQUERO, M. P. Iron bioavailability from food fortification to precision nutrition. A review. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 51, p. 126-138, 2019.
- BOLAND, M. J. et al. The future supply of animal-derived protein for human consumption. **Trends in Food Science & Technology**, v. 29, n. 1, p. 62-73, 2013.
- BRAGAGNOLO, N. **Analysis of cholesterol in edible animal by-products.** CRC Press: New York, NY, USA, 2011.
- BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952.** Aprova o novo regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal-RIISPOA. 2017.
- CHOI, Y.-S. et al. Replacement of Pork Meat with Pork Head Meat for Frankfurters. **Korean journal for food science of animal resources**, v. 36, n. 4, p. 445-451, 2016.

- DA COSTA, C. G. C. et al. Protein concentrates obtained from pig by-products using pH-shifting technique: a preliminary study. **Ciencia Rural**, v. 49, 2019.
- DARINE, S.; CHRISTOPHE, V.; GHOLAMREZA, D. Production and functional properties of beef lung protein concentrates. **Meat Science**, v. 84, n. 3, p. 315-322, 2010.
- DARINE, S.; CHRISTOPHE, V.; GHOLAMREZA, D. Emulsification properties of proteins extracted from beef lungs in the presence of xanthan gum using a continuous rotor/stator system. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 1179-1188, 2011.
- DESMOND, E. M.; KENNY, T. A. Preparation of surimi-like extract from beef hearts and its utilisation in frankfurters. **Meat Science**, v. 50, n. 1, p. 81-89, 1998.
- DEVINE, C.; DIKEMAN, M. **Encyclopedia of meat sciences**. Elsevier, 2014.
- DEWITT, C. A. M.; GOMEZ, G.; JAMES, J. M. Protein extraction from beef heart using acid solubilization. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 9, p. 3335-3341, 2002.
- DI BERNARDINI, R. et al. Isolation, purification and characterization of antioxidant peptidic fractions from a bovine liver sarcoplasmic protein thermolysin hydrolyzate. **Peptides**, v. 32, n. 2, p. 388-400, 2011.
- DRUMMOND, L.; ÁLVAREZ, C.; MULLEN, A. M. Chapter 4 - Proteins Recovery From Meat Processing Coproducts. In: GALANAKIS, C. M. (Ed.). **Sustainable Meat Production and Processing**: Academic Press, p.69-83, 2019.
- EC, R. Regulation (EC) no 1069/2009 of the European Parliament and of the council of 21 October 2009 laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing regulation (EC) no 1774/2002. **Animal by-products regulation**: p. 300, 2009.
- FAO. The future of food and agriculture: alternative pathways to 2050. **Food and Agriculture Organization of the United Nations.**, v. Rome, 2018.
- FDA. Interim final rule — Use of materials derived from cattle in human food and cosmetics. **Food Drug Administration. Federal Register.**, v. 69, n. 134, 2004.
- FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Fennema's food chemistry**. CRC press, 2017.
- FONTES, P. et al. Composition and color stability of carbon monoxide treated dried porcine blood. **Meat science**, v. 85, n. 3, p. 472-480, 2010.
- FONTES, P. R. et al. Color evaluation of carbon monoxide treated porcine blood. **Meat Science**, v. 68, n. 4, p. 507-513, 2004.
- GALANAKIS, C. M. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n. 2, p. 68-87, 2012.

- GALANAKIS, C. M. **Sustainable meat production and processing**. Academic Press, 2018.
- GARCÍA-LLATAS, G. et al. 11 minerals and trace elements. **Handbook of analysis of edible animal by-products**, 2011.
- GEHRING, C. et al. Functional and nutritional characteristics of proteins and lipids recovered by isoelectric processing of fish by-products and low-value fish: A review. **Food chemistry**, v. 124, n. 2, p. 422-431, 2011.
- GEORGE, J. P.; DATTA, A. Development and validation of heat and mass transfer models for freeze-drying of vegetable slices. **Journal of Food Engineering**, v. 52, n. 1, p. 89-93, 2002.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1813-1827, 2011.
- GOMIDE, L. D. M.; RAMOS, E.; FONTES, P. Ciência e qualidade da carne: fundamentos. Viçosa: **Editora UFV**, p. 155-185, 2013.
- HEANEY, R. P. Calcium, dairy products and osteoporosis. **Journal of the American college of nutrition**, v. 19, n. sup2, p. 83S-99S, 2000.
- HONIKEL, K. Composition and Calories. **In: Nollet LML, Toldrá F, editors. Handbook of Analysis of Edible Animal By-Products**: CRC Press, 2011.
- HRYNETS, Y. et al. Comparative study on the effect of acid-and alkaline-aided extractions on mechanically separated turkey meat (MSTM): Chemical characteristics of recovered proteins. **Process biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 335-343, 2011.
- HUGHES, J. et al. A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness. **Meat science**, v. 98, n. 3, p. 520-532, 2014.
- ISHWARYA, S. P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; STAPLEY, A. G. F. Spray-freeze-drying: A novel process for the drying of foods and bioproducts. **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n. 2, p. 161-181, 2015.
- IWANIAK, A. et al. Food protein-originating peptides as tastants-Physiological, technological, sensory, and bioinformatic approaches. **Food Research International**, v. 89, p. 27-38, 2016.
- JAYAWARDENA, S. R. et al. Utilisation of beef lung protein powder as a functional ingredient to enhance protein and iron content of fresh pasta. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 3, p. 610-618, 2019.
- JOO, S. et al. The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. **Meat science**, v. 52, n. 3, p. 291-297, 1999.
- KHIARI, Z. et al. Poultry protein isolate prepared using an acid solubilization/precipitation extraction influences the microstructure, the functionality and the consumer acceptability of a processed meat product. **Food Structure**, v. 2, n. 1-2, p. 49-60, 2014.

KO, Y. M.; PARK, J. H.; YOON, K. S. Nitrite formation from vegetable sources and its use as a preservative in cooked sausage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 6, p. 1774-1783, 2017.

KROKIDA, M.; PHILIPPOPOULOS, C. Volatility of apples during air and freeze drying. **Journal of Food Engineering**, v. 73, n. 2, p. 135-141, 2006.

LAFARGA, T.; HAYES, M. Effect of pre-treatment on the generation of dipeptidyl peptidase-IV- and prolyl endopeptidase-inhibitory hydrolysates from bovine lung. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 56, n. 1, p. 12-24, 2017.

LAWRIE, R. Ciência da carne, 6ª edição. **Porto Alegre: Ed. Artmed**, 2005.

LINDSAY, A. E. A. WHO/FAO Guidelines on Food Fortification with Micronutrients. . **Geneva: WHO**, 2006.

LIU, D.-C. **Better utilization of by-products from the meat industry**. Food and Fertilizer Technology Center, 2002.

LIVINGSTON, D.; BROWN, W. The chemistry of myoglobin and its reactions. **Food Technology**, n. RESEARCH, 1981.

LONG, J. M.; MOHAN, A. Development of meat powder from beef byproduct as value-added food ingredient. **LWT**, v. 146, p. 111460, 2021.

LÓPEZ, M. A. A.; MARTOS, F. C. Iron availability: An updated review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 55, n. 8, p. 597-606, 2004.

LYNCH, S. A. et al. Optimization of protein recovery from bovine lung by pH shift process using response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 5, p. 1951-1960, 2018a.

LYNCH, S. A. et al. Opportunities and perspectives for utilisation of co-products in the meat industry. **Meat Science**, v. 144, p. 62-73, 2018b.

LYNCH, S. A. et al. Harnessing the potential of blood proteins as functional ingredients: A review of the state of the art in blood processing. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 16, n. 2, p. 330-344, 2017.

MALUF, J. U. et al. Optimization of the porcine liver enzymatic hydrolysis conditions. **Journal of Food Process Engineering**, v. 43, n. 4, p. e13370, 2020.

MARCET, I. et al. The use of sub-critical water hydrolysis for the recovery of peptides and free amino acids from food processing wastes. Review of sources and main parameters. **Waste management**, v. 49, p. 364-371, 2016.

MARTI, D.; JOHNSON, R. J.; MATHEWS, K. H. **Where's the (not) Meat?: Byproducts from Beef and Pork Production**. Citeseer, 2011.

MASSINGUE, A. A. et al. Effect of washing cycles and solutions on chemical composition and physicochemical properties of the surimi-like material from mechanically deboned turkey meat. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 5, p. e13929, 2019.

MATAK, K. E.; TAHERGORABI, R.; JACZYNSKI, J. A review: Protein isolates recovered by isoelectric solubilization/precipitation processing from muscle food by-products as a component of nutraceutical foods. **Food Research International**, v. 77, p. 697-703, 2015.

MOLLER, J. K.; SKIBSTED, L. H. Nitric oxide and myoglobins. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 1167-1178, 2002.

MONTERO CASTILLO, P. M. et al. Protein Quality of Rice Drinks Fortified with Bovine and Porcine Blood Plasma. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 68, n. 1, p. 7487-7496, 2015.

MORA, L. et al. Possible uses of processed slaughter byproducts. In: (Ed.). **Sustainable Meat Production and Processing**: Elsevier, p.145-160, 2019.

MUJUMDAR, A.-S. Principles, classification, and selection of dryers. **Handbook of industrial drying**, v. 3, p. 3-32, 2006.

MULLEN, A.; ÁLVAREZ, C. Offal: types and composition. **The Encyclopedia of Food and Health**, p. Academic Press, United Kingdom, 2016.

MULLEN, A. M. et al. Chapter 2 - Classification and target compounds. In: GALANAKIS, C. M. (Ed.). **Food Waste Recovery**. San Diego: Academic Press, p.25-57, 2015.

MULLEN, A. M. et al. Alternative uses for co-products: Harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. **Meat Science**, v. 132, p. 90-98, 2017.

MUMENTHALER, M.; LEUENBERGER, H. Atmospheric spray-freeze drying: a suitable alternative in freeze-drying technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 97-110, 1991.

NAYAK, R.; KENNEY, P. B.; SLIDER, S. Protein extractability of turkey breast and thigh muscle with varying sodium chloride solutions as affected by calcium, magnesium and zinc chloride. **Journal of food science**, v. 61, n. 6, p. 1149-1154, 1996.

NOLLET, L. M.; TOLDRA, F. **Handbook of analysis of edible animal by-products**. CRC Press, 2011.

NOLSØE, H.; UNDELAND, I. The Acid and Alkaline Solubilization Process for the Isolation of Muscle Proteins: State of the Art. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, n. 1, p. 1-27, 2009.

NUCKLES, R. O.; SMITH, D. M.; MERKEL, R. A. Meat By-product Protein Composition and Functional Properties in Model Systems. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 3, p. 640-643, 1990.

O'KEEFFE, M.; HOOD, D. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation on beef from muscles of differing colour stability. **Meat Science**, v. 7, n. 3, p. 209-228, 1982.

OCKERMAN, H. W.; BASU, L.; TOLDRÁ, F. Edible By-products. In: (Ed.). **Lawrie's Meat Science**: Elsevier, p.679-696, 2017.

PALACIOS, C. et al. Current calcium fortification experiences: A review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1484, n. 1, p. 55-73, 2021.

PARÉS, D. et al. RSM Optimization for the Recovery of Technofunctional Protein Extracts from Porcine Hearts. **Foods**, v. 9, n. 12, p. 1733, 2020.

PARK, S. et al. Composition of Surimi-like Material from Beef or Pork. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 4, p. 717-720, 1996.

PARK, S. K.; BAE, D.; HETTIARACHCHY, N. Protein concentrate and adhesives from meat and bone meal. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 11, p. 1223-1227, 2000.

PEARL, G. G. Animal By-Products: Biological and Industrial Products. **Encyclopedia of Animal Science**, p. 19-21, 2005.

PEARSON, C. L. Animal glues and adhesives. **Handbook of adhesive technology**, p. 479-494, 2003.

PEREIRA, A. D. et al. Evaluation of mortadella formulated with carbon monoxide-treated porcine blood. **Meat Science**, v. 97, n. 2, p. 164-173, 2014.

PIAZZA, G.; GARCIA, R. Meat & bone meal extract and gelatin as renewable flocculants. **Bioresource technology**, v. 101, n. 2, p. 781-787, 2010.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. **Ciencia de la carne y de los productos cárnicos**. 2ª. ed. 1994.

RAMOS, E.; GOMIDE, L. Avaliação da Qualidade de Carnes: Fundamentos e Metodologías: **Editorial Viçosa UFV**, 2017.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of food engineering**, v. 49, n. 4, p. 311-319, 2001.

RESHAN JAYAWARDENA, S. et al. Effect of drying temperature on nutritional, functional and pasting properties and storage stability of beef lung powder, a prospective protein ingredient for food supplements. **LWT**, v. 161, p. 113315, 2022.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de alimentos. **São Paulo: Blucher**, v. 2ª edição., p. 184, 2007.

SANS, P.; COMBRIS, P. World meat consumption patterns: An overview of the last fifty years (1961–2011). **Meat Science**, v. 109, p. 106-111, 2015.

SELMANE, D.; CHRISTOPHE, V.; GHOLAMREZA, D. Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties. **Meat Science**, v. 79, n. 4, p. 640-647, 2008.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações. In: (Ed.). **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações**, p.517-517, 1996.

SHELEF, L. Microbial spoilage of fresh refrigerated beef liver. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 39, n. 3, p. 273-280, 1975.

SILVA, D. R. G. et al. Reducing the safety risk of low nitrite restructured sliced cooked ham by gamma radiation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 1, p. e15071, 2021.

SINDELAR, J. J. Investigating uncured no nitrate or nitrite added processed meat products. **Iowa State University**, 2006.

SPINELLI, S. et al. Food by-products to fortified pasta: A new approach for optimization. **Journal of Cleaner Production**, v. 215, p. 985-991, 2019.

STEEN, L. et al. Functional properties of pork liver protein fractions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 6, p. 970-980, 2016.

STROM-ANDERSEN, N. Innovation and by-product valorization: A comparative analysis of the absorptive capacity of food processing firms. **Journal of Cleaner Production**, v. 253, p. 119943, 2020.

TAHERGORABI, R. et al. Effect of isoelectric solubilization/precipitation and titanium dioxide on whitening and texture of proteins recovered from dark chicken-meat processing by-products. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 896-903, 2011.

TAHERGORABI, R. et al. A three-prong strategy to develop functional food using protein isolates recovered from chicken processing by-products with isoelectric solubilization/precipitation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 12, p. 2534-2542, 2012.

TOLDRA, F. Introduction—Offal Meat: Denitions, Regions, Cultures, and Generalities. In: (Ed.). **Handbook of analysis of edible animal by-products**: CRC Press, p.18-27, 2011.

TOLDRÁ, F. et al. Innovations in value-addition of edible meat by-products. **Meat science**, v. 92, n. 3, p. 290-296, 2012.

TOLDRÁ, F.; MORA, L.; REIG, M. New insights into meat by-product utilization. **Meat Science**, v. 120, p. 54-59, 2016.

TOLDRÁ, F.; REIG, M.; MORA, L. Management of meat by- and co-products for an improved meat processing sustainability. **Meat Science**, v. 181, p. 108608, 2021.

TOLDRÀ, M. et al. Recovery and Extraction of Technofunctional Proteins from Porcine Spleen Using Response Surface Methodology. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 2, p. 298-312, 2019.

TOLDRÀ, M. et al.. Utilisation of protein fractions from porcine spleen as technofunctional ingredients in emulsified cooked meat sausages. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 2, p. 871-877, 2020.

TOLDRÀ, M. et al. Surimi-like protein ingredient from porcine spleen as lean meat replacer in emulsion-type sausages. **Meat Science**, v. 182, p. 108640, 2021.

TSERMOULA, P. et al. Functional protein rich extracts from bovine and porcine hearts using acid or alkali solubilisation and isoelectric precipitation. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 4, p. 1292-1298, 2019.

VILLALOBOS-DELGADO, L. H. et al. Quality of cooked sausages with added beef or pork heart surimi. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 12, p. e14939, 2020.

WHO, W. H. O. Nutritional anaemias: tools for effective prevention and control. **Ed. Geneva: World Health Organization.**, p. 93, 2017.

WHO, W. H. O.; FAO, F. A. O. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. 2nd ed. **Geneva, Switzerland: World Health Organization**, 2004.

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

ZHANG, C.; GARCIA, R. A.; PIAZZA, G. J. Solubilization of meat & bone meal protein by dilute acid hydrolysis for the production of bio-based flocculant. **Food and bioproducts processing**, v. 102, p. 362-366, 2017.

ZHANG, W. et al. Improving functional value of meat products. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 15-31, 2010.

ZHAO, X. et al. Application of isoelectric solubilization/precipitation processing to improve gelation properties of protein isolated from pale, soft, exudative (PSE)-like chicken breast meat. **LWT-Food science and technology**, v. 72, p. 141-148, 2016.

ZOUARI, N. et al. Turkey liver: Physicochemical characteristics and functional properties of protein fractions. **Food and Bioproducts processing**, v. 89, n. 2, p. 142-148, 2011.

ZOUARI, N. et al. Turkey liver: Physicochemical characteristics and functional properties of protein fractions. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 2, p. 142-148, 2011.

PARTE II - ARTIGOS

ARTIGO I

Artigo redigido conforme a norma do periódico *Food and Bioproducts Processing*
“Submetido para publicação”

EXTRACTION OF PROTEINS FROM AQUEOUS AND SALT SOLUTIONS OF PORCINE EDIBLE BY-PRODUCTS USING THE PH-SHIFTING TECHNIQUE

Extração proteica de subprodutos comestíveis de suínos com soluções aquosa e salina

Abstract

The use of aqueous and saline solution and the treatment with sodium nitrite in the protein extraction by *the pH-shifting technique* of edible pig byproducts (heart and liver) were evaluated. Protein solubility curves were obtained, and the optimal pH of solubility (PS) and precipitation (isoelectric point, pI) were defined. The addition of salt increases the solubility in alkaline pH (11.0) for both byproducts, being set at 2.0 for the liver and 3.0 for the heart. The precipitation yields of the total protein were lower in the aqueous heart extracts (71.75%) than in the other extracts (84.23%), but the precipitation yield of total heme pigments (77.63%) was not affected by the treatments or byproduct type. The yield of protein recovery was higher in liver extracts (68.04%) than in heart extracts (49.98%), regardless of the extraction solution used. The increasing additions of nitrite increased the levels of residual nitrite (NO₂R) on the precipitates, but lower additions were enough to favor the formation of the pinkish-red color characteristic of cured meat products, by increasing the redness (a^*) and reducing the hue angle (h) color. Higher values of NO₂R and a^* and lower values of h were also observed in the precipitates extracted by the saline solution when compared to those obtained by the aqueous solution. Thus, the use of saline solutions supplemented with 20 mg/mL sodium nitrite proved to be a viable alternative in protein recovery processes in pig byproducts, especially in livers, being a promising alternative to development of techno-functional ingredients to use in meat products.

Keywords: Heart; liver; color stabilization; nitrite; functional properties; yield of recovered protein.

Introduction

In recent years, the pork market has been growing progressively in Brazil. According to data reported by the Brazilian Association of Animal Protein (ABPA), there was a progressive growth in pig production, reaching approximately 4.701 million tons in 2021 (ABPA 2022). With the increase in the production of meat and processed pork products, large quantities of byproducts from the slaughter process are generated, including edible byproducts such as “giblets”, which in Brazil include some organs and parts of the animal, such as the heart, liver, kidneys, brain, tongue, stomach, foot, ears, mask, and tail (Brasil 2017). Some of these giblets have great nutritional value, especially the organs, but they are rarely used for *fresh* consumption and are intended for processed meat products or for export (Costa et al. 2019). In addition, according to Toldrá et al. (2021), traditional markets for edible byproducts gradually decreased due to concerns about their quality and health, leading to a greater focus on nonfood uses, such as pet food, animal feed, pharmaceuticals, cosmetics, fertilizers, and sources of biodiesel fuel. With regard to organs, they have a high protein content, equivalent to that found in lean meats (16-22%), and are of high biological value, being an important source of essential and nonessential amino acids, and vitamins and minerals, especially iron-heme, important for human nutrition (Mullen and Álvarez 2016; Seong et al. 2014). In addition to their nutritional value, organ proteins may have excellent technological functions, with emulsifying and gelling properties that enhance the flavor of food products and contribute to improving their sensory quality (Parés et al. 2020; Tsermoula et al. 2019; Toldrá et al. 2021). Thus, the need for a more rational and efficient use of these byproducts is essential for the profitability of the pork industry.

A viable use of these byproducts is protein concentrates, which have high biological value and technological functionality and can be used as fortifiers (protein and/or iron) for food or even as functional ingredients in the preparation of meat products. Among the various protein recovery techniques, isoelectric solubilization/precipitation (ISP), a method also known as pH-shifting, allows an efficient recovery of proteins of high nutritional quality and with improved functional properties (Hrynets et al. 2011). In the ISP process, the proteins are first solubilized at acidic or alkaline pH, followed by an adjustment in the pH of the solution to its isoelectric point (pI) for separation of neutral and membrane lipids and precipitation of meat proteins (Nolsøe and Undeland 2009). This technique has been successfully used in studies to obtain protein concentrates from animal sources, such as fish (Pezeshk et al. 2021; Álvarez et al.

2018), beef (Dewitt et al. 2002; Lynch et al. 2018; Tsermoula et al. 2019), pork (Tsermoula et al. 2019; Toldrà et al. 2019; Costa et al. 2019; Steen et al. 2016) and poultry (Zhao et al. 2016).

Since obtaining protein concentrates by the ISP process initially involves the dissolution of proteins before their separation by precipitation, protein solubility becomes an important property for the determination of ideal and optimal conditions for their extraction, directly influencing the yield and the final quality of the protein extract (Chen et al. 2017). According to their solubility, meat proteins are grouped into three classes: sarcoplasmic proteins, which are soluble in water or in very low ionic strength solutions (<0.2 M); myofibrillar proteins, which require saline solutions with higher ionic strength (> 0.3 M) to solubilize; and stromal proteins, which remain insoluble even in saline solutions with high ionic strength (Ramos and Gomide 2017). Thus, in addition to adjusting the solubilization pH, the use of monovalent salts, such as sodium chloride (NaCl), associated with low concentrations of divalent salts, such as magnesium chloride (MgCl₂) or calcium chloride (CaCl₂), allows optimization of the extraction process and directly influences the yield and final quality of the protein extract obtained, affecting its physicochemical characteristics and functional properties, such as the emulsifying and gelling capacities (Nayak et al. 1996; Parés et al. 2020; Steen et al. 2016).

The color of the protein extract obtained is another important property when applied to foods, especially as an ingredient in the preparation of meat products. In the ISP process, a large amount of heme pigments (myoglobin and hemoglobin) are extracted, which are oxidized and generate a blackish color (Costa et al. 2019). An alternative to circumvent the color problem would be the use of nitrite salts in the extract before protein precipitation, since they interact with heme pigments, forming more heat-stable nitrous pigments with an attractive pink color (Ramos and Gomide 2017). In addition, nitrite salts are commonly used in meat products as preservatives since they perform important and distinct functions as a color, flavor, and aroma agent characteristic of cured products and as an antioxidant in the control of lipid oxidation (Dutra et al. 2017).

Therefore, the objective of this study was to obtain and characterize protein extracts of two edible byproducts of pigs (liver and heart) using water and saline solutions for extraction and to evaluate the use of different concentrations of sodium nitrite to improve and stabilize the color of the extracts.

Material and methods

Raw material

Pig byproducts (heart and liver) frozen (-18 °C) and vacuum packed were supplied by a local slaughterhouse (Nutrali, Lavras, Minas Gerais, Brazil) and transported to the Laboratory of Meat Science and Technology (LabCarnes) at Federal University of Lavras (UFLA). The analyses to determine the chemical composition and physicochemical quality were performed in triplicate in three samples (lots) collected on different days but under the same conditions. Each sample consisted of a homogeneous mixture of at least five different offals.

The chemical composition of the raw samples was determined according to the methods of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC 2012): 960.52 for protein, using a conversion factor of 6.25; 925.45b for moisture; 920.39 for fat; and 923.03 for ash content. The pH measurements were made with a pH meter (HI 99163; Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) by insertion into chopped samples. The total collagen content (expressed in mg/g) was determined by colorimetric quantification of the amino acid hydroxyproline (using a conversion factor of 8.0) according to the 990.26 method (AOAC 2012). The heme pigment content (expressed in µg of hematin/g) was determined by the acid hematin method proposed by Hornsey (1956) and described by Ramos and Gomide (2017). The analyses were performed in triplicate.

Protein solubility curves

In the presence of NaCl, the functionality of salt-soluble proteins can be improved by using a low concentration of divalent salts. Therefore, to assess the effects on the amount and type of proteins extracted, two extraction solutions were evaluated: 1) aqueous solution; and 2) low ionic strength saline solution containing 4% (w/v) sodium chloride (NaCl) and 0.05% (w/v) magnesium chloride (MgCl₂). The combination of these salts was chosen based on the increase in the protein solubility observed by Nayak et al. (1996) in turkey thigh muscle.

The protein solubility curves, as a function of pH variation, were constructed to determine the maximum (PS) and minimum (isoelectric point, pI) solubility in each byproduct, according to the methodology described by Costa et al. (2019), with modifications. Briefly, the raw material of the offal was homogenized in turrax (TE-102; Tecnal Equipamentos Científicos, Piracicaba, São Paulo, Brazil) with cold extraction solution (2-4 °C) at a ratio of 1:40 (w/v) for 2 min. Aliquots of 30 mL of the homogenate were adjusted from pH 1.0 to 12.0 (in 0.5 intervals) using HCl or NaOH solutions (0.2 M or 1.0 M) with a potentiometer (model DM 20; Digimed,

São Paulo, Brazil). The homogenate was centrifuged (Hettich EBA 21 centrifuge; Hettich GmbH & Co. KG, Germany) at $3000 \times g$ for 20 min, and the protein concentration (mg/mL) of each supernatant was determined using the Biuret colorimetric method described by Ramos and Gomide (2017). Three repetitions were performed for each measurement.

Extraction procedures

Protein extraction and nitrite treatment

After analyzing the solubility curve of each byproduct, the PS and pI were selected to obtain the protein isolates for each extraction solution (aqueous and saline). Before extraction, the solutions were adjusted to the target pH using HCl or NaOH solutions (0.2 M or 1.0 M). For each byproduct, 200 g of raw material was homogenized with cold (2-4 °C) extraction solution (PS) at a ratio of 1:5 (w/v) for 15 min using an industrial mixer. The homogenate was centrifuged at $3000 \times g$ for 20 min, the upper layer of fat was removed, and the supernatant was separated (PS extract). To evaluate the effects of sodium nitrite (NaNO_2) on protein characterization, the PS extracts were added to different concentrations of NaNO_2 to reach final solutions containing 10, 20 and 40 mg NO_2/L . Then, the pH of the treated PS extract was adjusted to pI, centrifuged at $3000 \times g$ for 20 min, and the pellet (precipitated proteins) and supernatant (pI extract) separated for further analysis. A control sample (without nitrite) was also evaluated. A schematic overview of the extraction procedure is shown in Figure 1.

Characterization of fractions of the extracts

Both supernatants (PS and pI extracts) were analyzed for protein and total heme pigment contents, as described by Ramos and Gomide (2017). The protein concentration (mg/mL) was determined by the Biuret colorimetric method, and the total heme pigment (THP) content was determined by the acid hematin method (μg hematin/mL) using an extinction coefficient of $4.80 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$, as proposed by Hornsey (1956). The yields of total precipitation of heme protein and pigment were calculated by equation Eq. 1:

$$PY (\%) = \frac{(PPS - PpI)}{PPS} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

where PY is the total protein or heme pigment precipitation yield, and PPS and PpI represent the total protein (mg/mL) or heme pigment content (μg hematin/mL) in the PS and pI extracts, respectively.

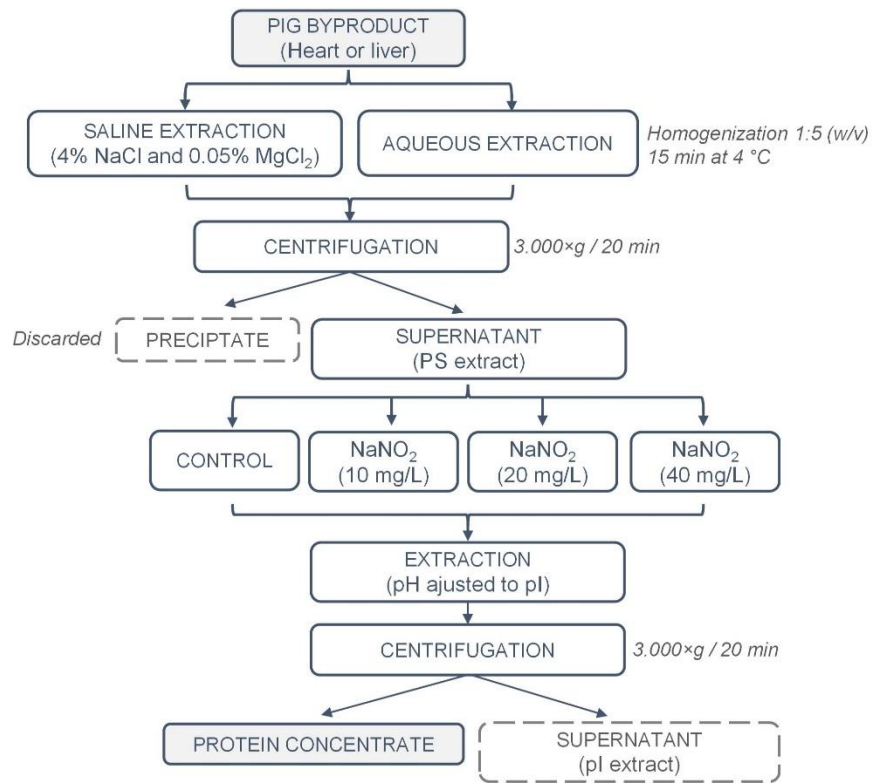


Figure 1. Flow chart of sequential extraction of the classic pH-shift process applied to pig byproducts.

The precipitated proteins were weighed, and the instrumental color was evaluated using a CM-700 portable spectrophotometer (Konica Minolta Sensing Inc, Osaka, Japan) with 8 mm aperture. The color indices were obtained with the D65 illuminant, excluding the specular component (SCE) and 10° for the observer angle. The CIELAB indices (L^* = lightness; a^* = redness and b^* = yellowness) and the angular coordinates of chroma (C^*) and hue angle (h , degrees) were recorded. After color analysis, the precipitated proteins were analyzed for residual nitrite content (NO_2R), as described by [Guimarães et al. \(2021\)](#), and for moisture and protein content, according to the official methods ([AOAC 2012](#)). The total yields of recovered protein and pigments were calculated as equation Eq.2.

$$RY (\%) = \frac{WRP}{WBP} \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

where RY is the total protein or heme pigment recovery yield, WRP represents the weight of the recovered protein (g, on a dry basis) or heme pigment (μg of hematin, on a dry basis), and

WBP is the weight of the byproduct protein (g, on a dry basis) or heme pigment (μg of hematin, on a dry basis).

Statistical analysis

All analyses were performed in triplicate. For the characterization of the byproducts used, the means were tested by analysis of variance (ANOVA) and, when necessary, compared by the Tukey test, considering a significance level of 5%. The data of the extracts were evaluated in a completely randomized design (DIC) with a 2 (type of byproducts) x 2 (type of solution) x 4 (nitrite concentration) factorial scheme. The variation between the means was also evaluated by analysis of variance (ANOVA) using the statistical package SAS, version 9.2 (Statistical Analysis System - SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), and differences at $P < 0.05$ (Duncan's new multiple range test) were considered significant.

Results and discussion

Physicochemical characteristics of raw pig byproducts

The characteristics of the liver and heart pig byproducts used in the extracts are described in Table 1. The liver had a higher pH ($P < 0.05$) than the heart. The values found in this study are close to those reported by [Steen et al. \(2016\)](#) for pig livers (6.40) and by [Parés et al. \(2020\)](#) for pig hearts (5.89).

The moisture content did not differ ($P > 0.05$) in relation to the byproducts, which had a mean value of 73.03 ± 1.82 , close to those reported for livers (71.59% and 73.90%) and hearts (75.87% and 75.72%) of pigs by [Seong et al. \(2014\)](#) and [Costa et al. \(2019\)](#), respectively. However, the heart had higher ($P < 0.05$) fat and ash content than the liver, a fact also observed by [Costa et al. \(2019\)](#) only for ash (1.22% for the heart versus 0.82% for the liver), while fat was higher in the liver (3.81%) than in the heart (2.57%). Nevertheless, in contrast, [Seong et al. \(2014\)](#) reported a higher ash content (1.34%) for the liver compared to the heart (0.81%) and a similar fat content ($\sim 3.75\%$) among these organs. It is important to note that variability found between the results of the proximate composition for the same types of byproducts can be explained by factors, such as breed/crossbreeding, sex, age, rearing, and diet.

Regarding proteins, the total content in the liver was higher ($P < 0.05$) than that in the heart. [Mullen et al. \(2017\)](#), when conducting a survey of the potential use of different meat byproducts and species, report a protein content of 17% for the pig heart and 19% for the pig liver. These percentages were lower than those of the present study, which showed values similar to the

22% found by [Nuckles et al. \(1990\)](#), [Seong et al. \(2014\)](#) and [Costa et al. \(2019\)](#) for the liver. Thus, these byproducts have great potential as a source of protein, with high biological value able to meet daily nutritional needs.

Table 1. Proximate composition (mean \pm standard deviation) of raw pig hearts and livers.

Characteristics	Pig byproduct		Pr > F ¹
	Heart	Liver	
pH	6.03 \pm 0.07	6.31 \pm 0.11	0.012
Moisture (%)	72.33 \pm 0.92	73.74 \pm 2.73	0.449
Protein (%)	21.43 \pm 0.05	23.61 \pm 0.44	0.048
Total collagen (mg/g)	7.55 \pm 0.55	6.24 \pm 1.39	0.205
Insoluble collagen (mg/g)	6.74 \pm 0.69	3.65 \pm 0.90	0.009
Soluble collagen (mg/g)	0.81 \pm 0.15	2.59 \pm 0.50	0.004
Heme pigments (μ g hematin/g)	113.9 \pm 25.48	165.92 \pm 12.5	0.017
Fat (%)	3.70 \pm 0.14	1.78 \pm 0.30	0.013
Ash (%)	1.59 \pm 0.73	1.05 \pm 1.99	0.001
CIE color			
Lightness, <i>L</i> *	45.69 \pm 1.34	31.36 \pm 4.60	0.002
Redness, <i>a</i> *	7.47 \pm 0.04	10.61 \pm 0.25	0.002
Yellowness, <i>b</i> *	6.44 \pm 0.42	9.49 \pm 2.31	0.177
Chroma, <i>C</i> *	9.87 \pm 0.3	14.28 \pm 1.72	0.032
Hue angle, <i>h</i> (°)	40.77 \pm 1.75	41.45 \pm 6.28	0.653

¹ Significant values ($P < 0.05$) were represented in bold.

The collagen and heme pigment contents were also analyzed due to their technological and nutritional importance. Although the total collagen protein content was not different ($P > 0.05$) (mean of 6.89 ± 0.97 mg/g) between the byproducts, a higher ($P < 0.05$) proportion of the soluble fraction was observed in the liver (41.51%) than in the heart (10.73%). Collagen is the main protein of the stroma, and in addition to having technological properties such as lower water and oil retention capacities ([Ramos and Gomide 2017](#)), stroma proteins have lower protein quality because they are composed of more expendable amino acids, such as glycine, proline and alanine ([Mullen and Álvarez 2016](#)). In general, the total collagen concentration observed in this experiment was higher than the values (3.40 mg/g) reported by [Nuckles et al. \(1990\)](#) for raw pig liver and lower than the values (34 mg/g) observed by [Lynch et al. \(2018\)](#) in chopped pig lungs.

Regarding heme pigments, the liver had a concentration approximately 1.45 times higher ($P < 0.05$) than the heart. Heme pigments are part of the group of conjugated sarcoplasmic

proteins, consisting mainly of myoglobin (Mb), muscle protein, hemoglobin (Hb), and blood protein, and are directly responsible for the coloration of the byproduct (Ramos and Gomide 2017). These pigments are also important because they contribute to heme iron in the diet. Heme iron is considered an organic form of the iron mineral because it is part of the heme prosthetic group of hemoglobin and myoglobin proteins with higher bioavailability (~ 15%) than nonheme iron (~ 5%) found in plants. In addition, the bioavailability of heme iron is not affected by other dietary components, and similar to vitamin C, its presence may increase the rate of absorption of nonheme iron by the body (López and Martos 2004). Due to its better use in the diet, heme iron is essential to combat and prevent anemia and is a very important component in the preparation of food fortifiers.

The higher pigment concentration in the liver justifies the more intense reddish tone of this organ, determined by the higher values of redness (a^*) and chroma (C^*), but with a darker color (lower values of lightness, L^*). The values for the yellowness (b^*) and hue angle (h°) did not differ ($P > 0.05$) between the byproducts, with means of 7.96 ± 1.36 and 41.11 ± 4.01 , respectively.

Protein solubility

The addition of salt increased the electronegativity of the proteins, resulting in a shift in the solubility curve to increase its solubility in alkaline pH values while displacing the apparent pI, indicated by minima in solubility for lower pH values (Figure 2).

For the liver extract, the highest protein solubility (4.69 mg/mL) was observed in alkaline medium (pH 11.0), both for extraction in aqueous medium and in saline solution. For the heart, however, while the highest solubility was also observed at pH 11.0 (3.14 mg/mL) when using saline solutions, in the aqueous extraction a greater solubility (4.39 mg/mL) was observed in acid medium (pH 1.0); approximately 1.67 times higher than the solubility (2.62 mg/mL) observed at pH 11.0.

With regard to pI, the use of a saline extraction solution clearly shifted values close to 5.0 in both byproducts to pI values close to 2.0 for the liver and 3.0 for the heart; at these pH values, the electrostatic forces are the lowest, and therefore, less water interacts with the protein molecules, which causes an increase in protein–protein interactions and leads to a decrease in solubility with consequent protein precipitation (Damodaran and Parkin 2017). The absence of increased protein extraction at higher alkaline pH when using saline solution in pig livers may

be due to higher levels of water-soluble proteins than salt-soluble proteins in pig livers (Steen et al. 2016).

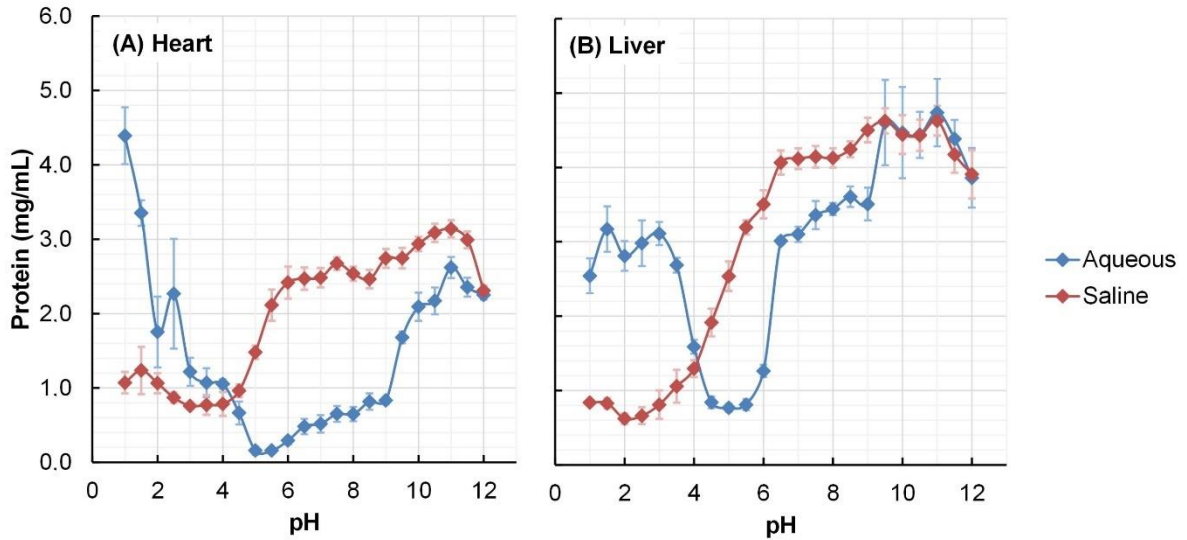


Figure 2. Protein solubility curves (mg/mL) of pigs heart (A) and liver (B) extracts obtained in aqueous and saline solution (4% NaCl; 0.05% MgCl₂) at pH values from 1 to 12. Bars represent the standard error of the mean (n = 3).

The differences observed in the protein solubility profile are attributed to the differences in the ionizable groups of the polypeptide chains of each evaluated byproduct (Damodaran and Parkin 2017; Toldrà et al. 2019). The number of positively charged ions at $\text{pH} > \text{pI}$ is lower than the number of negatively charged ions, and the inverse is observed at $\text{pH} < \text{pI}$. With the addition of NaCl, it is suggested that the negative Cl⁻ ions, which have a great ability to interact with protein molecules, neutralize the positive charges, while the opposite effects of the Na⁺ cation are much lower due to their weak association with negative charges of proteins (Damodaran and Parkin 2017). This explains the pI displacement and the increase in protein solubility in values above the pI when using the saline solution.

Tsermoula et al. (2019) also observed an extraction behavior similar to this study for bovine and porcine heart proteins in the pH range of 2.0 to 11.0, with low protein extraction capacity (pI) at pH 6.0 and greater protein extraction capacity at pH 2.0 and 11.0. Evaluating the extraction of heart proteins from cattle at acidic pH, Dewitt et al. (2002), in addition to observing a greater protein extraction at pH 1.0-2.0, also observed that the increasing addition of NaCl (up to 200 mM) reduced the protein solubility of bovine heart and shifted the pI from values close to 6.0 to lower values (between 4.5 and 5.5), as observed in the present experiment.

Similarly, [Costa et al. \(2019\)](#), when evaluating the protein extraction of the liver, kidney and heart byproducts of pigs in aqueous solutions, found that the protein solubility was higher in alkaline pH values for the liver (5.23 mg/mL, between pH 9.0 and 12.0) and kidney (3.81 mg/mL, between pH 9.0 and 10.0) than for acidic pH values (2.89 mg/mL for liver and 3.53 mg/mL for kidney, both at pH 2.5). For the heart, a higher protein solubility (mean of 3.42 mg/mL) was observed at acidic (pH 2.0) and alkaline (pH 12.0) pH values, corroborating what was reported in this study. Additionally, as observed in this study, these authors reported that the PIs of the heart and liver proteins of pigs were close to the pH value of 5.0. Other studies corroborate these results in porcine cardiac proteins ([Kim et al. 2017](#)) and in other sources, such as the spleen ([Toldrà et al. 2019](#)).

[Lynch et al. \(2018\)](#), optimizing the optimal conditions for the recovery of pig and bovine lung proteins using the isoelectric precipitation technique, reported that the adjustment of the extraction solution in alkaline medium, notably pH 10.8, would be one of the optimal conditions of the process. Therefore, for the following steps of characterization and color stability and based on the protein extraction profile (Figure 2), it was decided to perform alkaline solubilization at pH 11.0 for all byproducts, followed by isoelectric precipitation at pH 5.0 for heart and liver extracted with aqueous solution and at pH 3.0 for heart and pH 2.0 for liver when extracted with saline solution.

Protein content and precipitation yield of protein fractions

The effects of the treatments with extraction solution (aqueous x saline) and sodium nitrite (up to 40 mg/mL) on the levels of protein and total heme pigment (PHT), as well as on the precipitation yield, of heart and liver extracts of swine before (PS extract) and after isoelectric precipitation (pI extract) are shown in Table 2.

For the PS extract (at pH 11.0), there was no interaction effect ($P > 0.05$) or isolate for any of the factors studied, except for the total protein content of the byproducts, where the values observed for the liver were higher ($P < 0.05$) than those of the heart. This is consistent with the protein contents observed in these raw organs represented in Table 1. In addition, the lower protein solubilization in the heart may be due to the higher concentration of insoluble collagen observed in this organ when compared to the liver. The observation that the presence of a denser collagen network, with a greater number of crosslinks, further hinders the solubilization of stromal proteins was also made by [Selmane et al. \(2008\)](#), justifying a low extraction yield (48%) in bovine lung proteins when compared to the yield of porcine lungs (40%).

Table 2. Effects of extract solution and sodium nitrite treatments on protein and total heme pigment (THP) contents of pig byproducts extracts at optimum pH solubility (PS extract) and after isoelectric precipitation (pI extract).

Characteristics	Byproduct		Extract solution		Nitrite added (mg/mL)			
	Heart	Liver	Aqueous	Saline	0	10	20	40
PS extract								
Protein content (mg/mL)	23.98±2.32 ^a	31.70±4.03 ^b	28.18±5.93	27.50±4.25	28.99±4.78	27.65±5.57	27.56±5.74	27.17±5.05
THP (µg hematin/mL)	67.72±9.14	76.80±9.91	76.35±12.5	68.17±13.86	84.79±15.74	61.5±11.57	70.2±12.65	72.56±14.07
pI extract								
Protein content (mg/mL)	2.56±0.91	2.54±1.26	2.79±1.24	2.31±0.87	2.33±0.97	2.41±0.96	2.96±1.52	2.51±0.84
THP (µg hematin/mL)	13.17±2.42	13.36±3.61	12.66±2.98	13.86±2.93	12.66±3.66	13.8±3.34	12.59±2.49	14.17±2.47
Precipitation yields (%)								
Total protein	89.07±4.45	91.97±3.62	89.40±5.30	91.64±2.58	91.80±3.54	90.66±4.78	89.41±4.35	90.20±4.74
Heme pigment	79.10±7.23	76.16±10.69	79.06±17.52	76.20±13.17	82.46±10.16	71.28±11.51	77.41±15.66	79.37±6.30

^{a-b} Means following by different letters, within the effect, differ (P<0,05).

For the total protein content in the pI extract ($P = 0.017$) and for the total protein precipitation yield ($P = 0.004$), a significant effect was observed for the interaction type of byproducts \times type of solution. In general, the concentration of protein retained in the pI extract was higher ($P < 0.05$) in the aqueous solution (3.31 ± 0.59 mg/mL) than in the saline solution (1.82 ± 0.39 mg/mL) (Figure 3A), which is consistent with the lower precipitation yield ($71.45 \pm 7.24\%$ vs. $84.81 \pm 3.96\%$) observed (Figure 3B). Conversely, for the liver, there was no ($P > 0.05$) difference in protein content (2.54 ± 1.24 mg/mL) or yield ($83.94 \pm 7.04\%$) between the extracts, only the yield for the heart differed from the extracts obtained with aqueous solution.

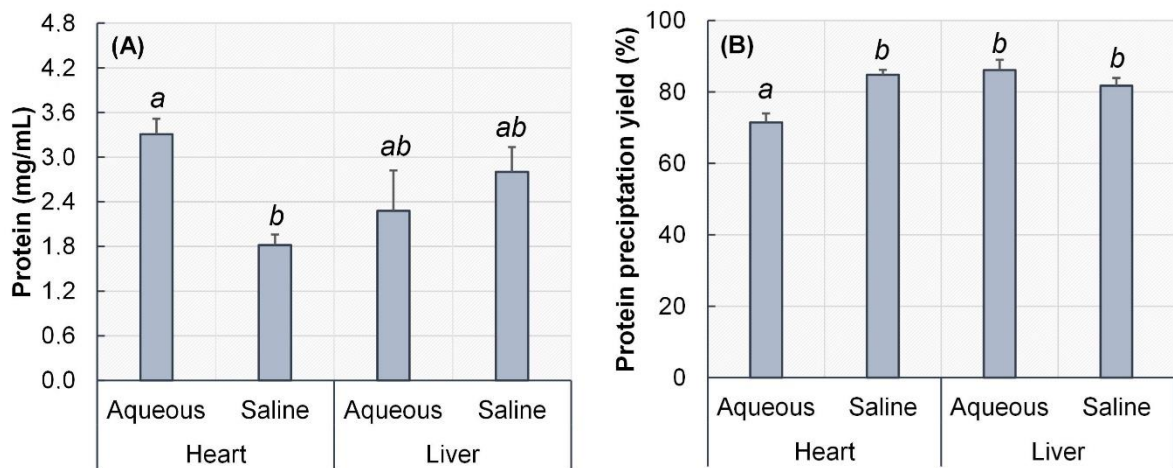


Figure 3. Protein content (A) in extracts after isoelectric precipitation (pI extract) and protein precipitation yields (B) from pigs heart and liver extracted with aqueous or saline solutions (4% NaCl; 0.05 MgCl₂). Bars represent the standard error of the mean ($n = 3$). Means with different letters (a, b) differ ($P < 0.05$) by Duncan's test.

It is important to note that the addition of sodium nitrite to the extraction solutions did not influence the protein content in the extracts before and after isoelectric precipitation and, consequently, did not influence the precipitation yield.

Protein recovery and composition of precipitated extracts

Table 3 describes the results obtained for the moisture, protein and residual nitrite (NO₂R) content, in addition to the protein recovery yield and the color indices of the precipitated extract.

Table 3. Effects of extract solution and sodium nitrite treatments on proximate composition, residual nitrite content (NO₂R), CIE color and yield of precipitated proteins from pig byproducts by pH-shift process.

	Byproduct		Extract solution		Nitrite added (mg/mL)			
	Heart	Liver	Aqueous	Saline	0	10	20	40
Proximate composition (%)								
Moisture	94.09±0.83	87.53±2.18	90.38±4.38	91.23±2.97	90.71±3.88	91.00±3.39	90.6±4.21	90.93±4.05
Protein	5.63±0.81	11.83±1.95	9.02±4.07	8.44±2.87	8.86±3.67	8.53±3.16	8.91±3.92	8.61±3.82
Protein recovered yield (%)	49.98±6.61 ^a	68.04±9.22 ^b	59.24±14.88	58.78±9.02	62.21±11.38	58.88±14.2	57.40±11.47	57.55±12.99
NO ₂ R (mg/Kg)	43.41±55.07	64.11±67.09	25.29±33.00	82.22±70.55	<i>nd</i>	31.75±27.09	67.50±52.82	115.78±67.92
CIE color								
Lightness, <i>L</i> *	48.78±4.7	47.88±4.95	46.95±4.53	49.71±4.71	47.21±3.25	49.62±5.18	47.22±6.20	49.28±5.21
Redness, <i>a</i> *	4.60±2.35	3.96±3.04	2.85±1.03 ^a	5.70±3.05 ^b	2.89±0.30 ^a	2.89±3.06 ^a	4.92±1.96 ^b	6.41±3.16 ^c
Yellowness, <i>b</i> *	8.15±2.41	6.91±3.23	7.91±2.64	7.15±3.13	7.67±0.80	5.81±4.20	8.01±3.31	8.63±2.19
Chroma, <i>C</i> *	9.65±2.24	7.98±4.24	8.35±2.81	9.28±4.02	8.21±0.69	6.63±4.96	9.68±2.75	10.75±3.44
Hue angle, <i>h</i> (°)	59.95±15.62	62.50±9.72	70.21±5.07 ^a	52.24±11.48 ^b	69.17±3.72 ^a	64.89±12.46 ^b	56.03±17.22 ^c	54.82±11.82 ^c

nd = not detected.

^{a-c} Means following by different letters, within the effect, differ (P<0,05).

Since no drying step subsequent to protein precipitation was conducted for protein concentration, the water content in the precipitates was high, and consequently, the protein content was low. Both the moisture content and the protein content of the precipitates were affected ($P > 0.05$) only by the type of byproduct, with the precipitates of the heart extracts having lower protein content and higher moisture content than those of the liver. The yield of protein recovery was also significantly higher in extracts prepared from pig livers than in those prepared from pig hearts, regardless of the extraction solution used. This is consistent with the higher protein content extracted in the solubilization step (PS extract) and subsequent precipitation (Figure 3) observed in the liver sample extraction process. [Parés et al. \(2020\)](#) reported that heart extracts obtained with the use of alkaline buffer, pH 8.6, and 2% NaCl showed both the best yield (72.82%) and the highest protein content (44.3%).

Protein yields of approximately 50% were obtained in several studies on the extraction of water-soluble proteins and salt from meat byproducts ([Nuckles et al. 1990](#); [Steen et al. 2016](#)). According to [Selmane et al. \(2008\)](#), the yields of protein recovery from pork and beef lungs were between 48 and 55%. In addition, [Tsermoula et al. \(2019\)](#) reported 51.53-55.74% total protein recovery in bovine and porcine hearts by means of alkaline and acid solubilization. Thus, both the yield and the protein concentration found in this study were satisfactory when compared to the other studies.

Regarding the residual nitrite content (NO_2R), there was an interaction ($P < 0.05$) nitrite concentration \times type of byproducts and nitrite concentration \times type of solution, which were decomposed and are shown in Figure 4. As the concentration of nitrite added to the PS extract increased, higher ($P < 0.05$) amounts of NO_2R were detected in the precipitates. This was expected because, in principle, higher amounts of nitrite induce a greater amount of residual nitrite. However, higher ($P < 0.05$) amounts of NO_2R were detected in the liver precipitates than in the heart, and an even greater difference was observed in the precipitates obtained with saline solution when compared to the aqueous solution.

Nitrite is a highly reactive compound that does not act directly as a nitrosating agent (nitric oxide transfer) but first forms one or more reactive intermediates ([Sebranek and Bacus 2007](#)). In solution, sodium nitrite is dissociated and remains in equilibrium with nitrous acid (HNO_2), which in an acidic environment can form its anhydride (N_2O_3) and then nitric oxide (NO), both in equilibrium. Nitrite is the conjugated base of nitrous acid (HNO_2) and has a pK_a of 3.37 at 25 °C ([Honikel 2008](#)). In an acidic environment, an equilibrium is established between the ionized salt and the nonionized nitrous acid, depending on the pH of the solution. The produced

NO reacts easily with iron (Fe), especially the heme iron of the pigments (myoglobin or hemoglobin) or the SH group in amino acids, e.g., cysteine or glutathione. In addition, the NO molecule itself can be easily oxidized to nitrite anion (NO_2^-) in the presence of oxygen (Honikel 2008; Pegg and Shahidi 2000). Thus, the differences related to byproducts and extraction solutions observed in Figure 4 cannot be explained by the amount of heme pigments for interaction with NO and the consequent reduction in residual values, since there was no significant difference in the concentrations of PHT in the PS and pI extracts and, consequently, the precipitation yield (Table 2).

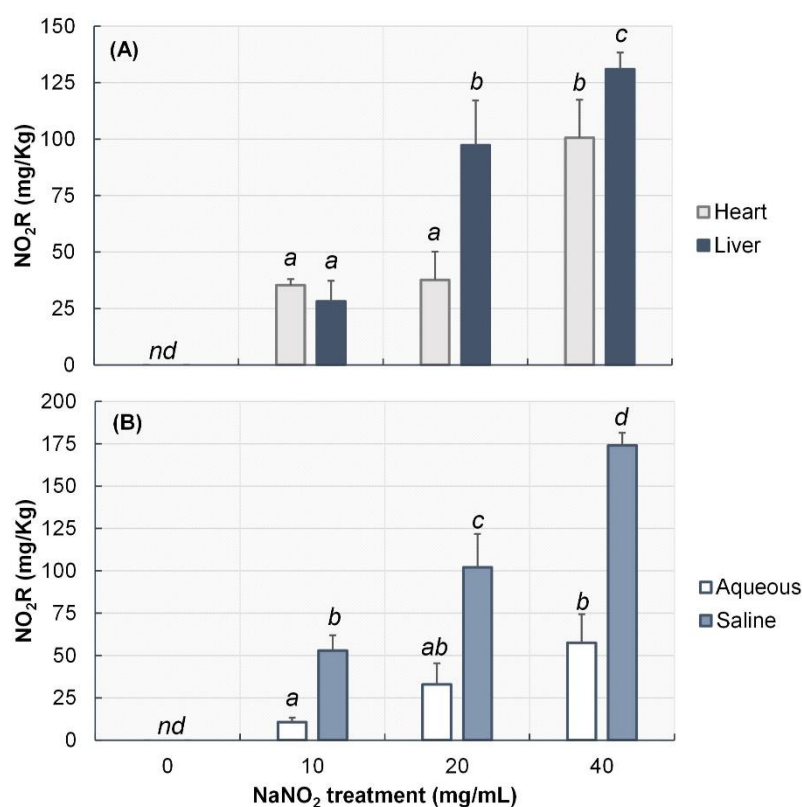


Figure 4. Effects of the interaction of sodium nitrite (NaNO_2) treatment with (A) type of byproducts (pig heart and liver) and with (B) type of solution (aqueous x saline) on residual nitrite content (NO_2R). Bars represent the standard error of the mean ($n = 3$). Means with different letters (a, b) differ ($P < 0.05$) by Duncan's test.

Another observation that should be made is that, due to the pKa of nitrous acid, practically all nitrite is in the form of anion in the PS extract (pH 11.0), with curing reactions not occurring. When the pH is adjusted to pI, in an acid medium, the curing reactions accelerate. This explains

the differences observed between the aqueous and saline extracts, since in the saline extracts the pH was adjusted to 2.0 (liver) and 3.0 (heart), which means that less than 50% are in the anion form, and therefore, the reaction moves toward the formation of NO. In addition, according to [Shahidi et al. \(2014\)](#), salts (sodium or potassium chloride) accelerate the curing reaction due to the formation of nitrosyl chloride (NOCl), which is a more powerful nitrosating species (conversion of organic compounds into NO derivatives) than N_2O_3 . A lower pH accelerates the formation of both nitrosating species (N_2O_3 and NOCl).

The differences observed between the heart and liver may be due to the greater interaction of NO with the HS group of some amino acids. According to [Seong et al. \(2014\)](#), the liver has higher amounts of methionine (0.36% vs. 0.21%) and cysteine (0.64% vs. 0.47%) than the heart. However, one must consider the effects of extraction by the pH variation technique and, consequently, the actual amount of each amino acid that was extracted in the process. In this sense, in a preliminary experiment (data not shown), the amount of methionine + cysteine observed in protein isolates obtained by the pH variation method (under the same conditions of this experiment, except for the presence of nitrite) was higher in the heart (19.43 mg/g protein) than in the liver (16.19 mg/g protein).

For the color indices, there was no interaction ($P > 0.05$) for any of the factors studied, and the lightness ($L^* = 48.33 \pm 4.84$), yellowness ($b^* = 7.53 \pm 2.73$) and chroma ($C^* = 8.81 \pm 3.14$) were not affected ($P > 0.05$). However, the redness (a^*) and the hue angle (h) were affected ($P < 0.05$) by the type of extraction solution and by the different nitrite concentrations used. Extraction with increasing amounts of sodium nitrite increased the a^* values and reduced the h values of the precipitates. Thus, greater additions of nitrite resulted in redder extracts, which are theoretically more attractive for use as ingredient in meat products.

However, although the a^* values may reflect important color changes, color is a three-dimensional attribute described by its luminosity (L^*) and angular coordinates (C^* and h), the latter determined by chromaticity indices (a^* and b^* values) ([Ramos and Gomide 2017](#)). In this sense, the h values also seem to indicate that the extraction with nitrite favored the formation of the pinkish-red color characteristic of the nitrosomyoglobin pigment. [Guimarães et al. \(2021\)](#) observed that cured cooked hams had a much darker red hue (lower h values) and lower color intensity (lower C^* values) than noncured hams. It is important to note that the precipitates with 20 and 40 mg/mL nitrite had the same shade of red from the nitrosomyoglobin formed, which allows us to conclude that the addition of 20 mg/mL was sufficient to obtain the cured color. Similarly, the cured color seems to have been favored in the precipitates obtained by saline

solution because the a^* values were ($P < 0.05$) higher and those of h were much lower than those obtained by aqueous precipitation. This may be due to the formation of the nitrosating species NOCl by the presence of NaCl, accelerating the curing reaction, as previously described.

Conclusions

The liver extracts had higher concentrations of total protein and proportions of soluble collagen than the heart extracts, obtaining precipitates with higher protein recovery yields, regardless of the extraction solution used (aqueous or saline). However, the precipitates obtained with saline solution had a pinkish-red color, characteristic of cured meat products, in the treatments containing smaller amounts (20 mg/mL) of sodium nitrite, which may be important for their use as techno-functional ingredients in meat products. Therefore, it was concluded that the process of protein recovery by the method of pH-shifting, using saline or aqueous solutions for the development of new food products, is a promising alternative to contribute to the better use of byproducts of the pork meat industry. The choice of the byproduct, as well as the use of aqueous or saline solution, will depend on the objective of the application of the isolates: as techno-functional ingredients; or as food fortifiers. These properties should be previously evaluated for the best choice regarding the purpose of use.

Acknowledgment

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Government of Mozambique, and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for granting doctoral scholarships to the first two authors.

Funding Information

The research was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG; CVZ APQ 02904-17).

References

ABPA (2022). Relatório Anual 2022. *Relatório Anual ABPA* (pp. 144). São Paulo, SP:

Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA).

Álvarez, C., Lélou, P., Lynch, S. A., & Tiwari, B. K. (2018). Optimised protein recovery from mackerel whole fish by using sequential acid/alkaline isoelectric solubilization

- precipitation (ISP) extraction assisted by ultrasound. *LWT*, 88, 210-216, doi:10.1016/j.lwt.2017.09.045.
- AOAC (2012). *Official methods of analysis of AOAC International* (19th ed.). Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists.
- Brasil (2017). Regulates Law No. 1,283, of December 18, 1950, and Law No. 7,889, of November 23, 1989, which provide for the Regulation of Industrial and Sanitary Inspection of Products of Animal Origin (in portuguese). In A. d. P. Executivo (Ed.), (62 ed., Vol. nº 9.013, de 29 de março de 2017, pp. 3-27). Brasília: Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.
- Chen, X., Tume, R. K., Xu, X., & Zhou, G. (2017). Solubilization of myofibrillar proteins in water or low ionic strength media: Classical techniques, basic principles, and novel functionalities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(15), 3260-3280, doi:10.1080/10408398.2015.1110111.
- Costa, C. G. C., Paula, M. M. O., Massingue, A. A., Torres Filho, R. A., Ramos, E. M., & Carneiro, J. D. S. (2019). Protein concentrates obtained from pig by-products using pH-shifting technique: a preliminary study. *Ciência Rural*, 49(06), e20181048, doi:10.1590/0103-8478cr20181048
- Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2017). *Fennema's Food Chemistry, Fifth Edition*: CRC Press LLC.
- Dewitt, C. A. M., Gomez, G., & James, J. M. (2002). Protein extraction from beef heart using acid solubilization. *Journal of Food Science*, 67(9), 3335-3341, doi:doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb09588.x.
- Dutra, M. P., Cardoso, G. P., Fontes, P. R., Silva, D. R. G., Pereira, M. T., Ramos, A. d. L. S., et al. (2017). Combined effects of gamma radiation doses and sodium nitrite content on the lipid oxidation and color of mortadella. *Food Chemistry*, 237(1), 232-239, doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.108.
- Guimarães, A. S., Guimarães, J. S., Araújo, A. B. S., Rodrigues, L. M., Carvalho, E. E. N., Ramos, A. d. L. S., et al. (2021). Characterization of natural curing agents from Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) for their use in clean label restructured cooked meat products. *LWT*, 150, 111970, doi:10.1016/j.lwt.2021.111970.
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78(1-2), 68-76, doi:10.1016/j.meatsci.2007.05.030.

- Hornsey, H. C. (1956). The colour of cooked cured pork. I. Estimation of the Nitric oxide-Haem Pigments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 7(8), 534-540, doi:10.1002/jsfa.2740070804.
- Hrynets, Y., Omana, D. A., Xu, Y., & Betti, M. (2011). Comparative study on the effect of acid- and alkaline-aided extractions on mechanically separated turkey meat (MSTM): Chemical characteristics of recovered proteins. *Process Biochemistry*, 46(1), 335-343, doi:10.1016/j.procbio.2010.09.006.
- Kim, H. K., Ha, S. J., Kim, Y. H., Hong, S. p., Kim, Y. U., Song, K.-M., et al. (2017). Protein extraction from porcine myocardium using ultrasonication. *Journal of Food Science*, 82(5), 1059-1065, doi:10.1111/1750-3841.13694.
- López, M. A. A., & Martos, F. C. (2004). Iron availability: An updated review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(8), 597-606, doi:10.1080/09637480500085820.
- Lynch, S. A., Álvarez, C., O'Neill, E. E., Keenan, D. F., & Mullen, A. M. (2018). Optimization of protein recovery from bovine lung by pH shift process using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 1951-1960, doi:10.1002/jsfa.8678.
- Mullen, A. M., & Álvarez, C. (2016). Offal: Types and Composition. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 152-157). Oxford: Academic Press.
- Mullen, A. M., Álvarez, C., Zeugolis, D. I., Henchion, M., O'Neill, E., & Drummond, L. (2017). Alternative uses for co-products: Harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. *Meat Science*, 132, 90-98, doi:10.1016/j.meatsci.2017.04.243.
- Nayak, R., Kenney, P. B., & Slider, S. (1996). Protein Extractability of Turkey Breast and Thigh Muscle with Varying Sodium Chloride Solutions as Affected by Calcium, Magnesium and Zinc Chloride. *Journal of Food Science*, 61(6), 1149-1154, doi:10.1111/j.1365-2621.1996.tb10950.x.
- Nolsøe, H., & Undeland, I. (2009). The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: state of the art. [journal article]. *Food and Bioprocess Technology*, 2(1), 1-27, doi:10.1007/s11947-008-0088-4.

- Nuckles, R. O., Smith, D. M., & Merkel, R. A. (1990). Meat by-product protein composition and functional properties in model systems. *Journal of Food Science*, 55(3), 640-643, doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb05196.x.
- Parés, D., Toldrà, M., Camps, E., Geli, J., Saguer, E., & Carretero, C. (2020). RSM optimization for the recovery of technofunctional protein extracts from porcine hearts. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(12), 1733, doi:10.3390/foods9121733.
- Pegg, R. B., & Shahidi, F. S. (2000). *Nitrite curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives* (1ed.). Trumbull, USA: Wiley-Blackwell.
- Pezeshk, S., Rezaei, M., Hosseini, H., & Abdollahi, M. (2021). Impact of pH-shift processing combined with ultrasonication on structural and functional properties of proteins isolated from rainbow trout by-products. *Food Hydrocolloids*, 118, 106768, doi:10.1016/j.foodhyd.2021.106768.
- Ramos, E. M., & Gomide, L. A. M. (2017). *Meat quality assessment: fundamentals and methodologies (in portuguese)* (2nd ed.). Viçosa, MG, Brazil: Editora UFV.
- Sebranek, J. G., & Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science*, 77(1), 136-147, doi:10.1016/j.meatsci.2007.03.025.
- Selmane, D., Christophe, V., & Gholamreza, D. (2008). Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties. *Meat Science*, 79(4), 640-647, doi:10.1016/j.meatsci.2007.10.029.
- Seong, P. N., Park, K. M., Cho, S. H., Kang, S. M., Kang, G. H., Park, B. Y., et al. (2014). Characterization of edible pork by-products by means of yield and nutritional composition. *Korean J Food Sci Anim Resour*, 34(3), 297-306, doi:10.5851/kosfa.2014.34.3.297.
- Shahidi, F., Samaranyaka, A. G. P., & Pegg, R. B. (2014). CURING | Brine Curing of Meat. In M. Dikeman, & C. Devine (Eds.), *Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition)* (pp. 416-424). Oxford: Academic Press.
- Steen, L., Glorieux, S., Goemaere, O., Brijs, K., Paelinck, H., Foubert, I., et al. (2016). Functional properties of pork liver protein fractions. *Food and Bioprocess Technology*, 9(6), 970-980, doi:10.1007/s11947-016-1685-2.
- Toldrà, F., Reig, M., & Mora, L. (2021). Management of meat by- and co-products for an improved meat processing sustainability. *Meat Science*, 181, 108608, doi:10.1016/j.meatsci.2021.108608.

- Toldrà, M., Parés, D., Saguer, E., & Carretero, C. (2019). Recovery and extraction of technofunctional proteins from porcine spleen using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 12(2), 298-312, doi:10.1007/s11947-018-2208-0.
- Tsermoula, P., Virgili, C., Ortega, R. G., Mullen, A. M., Álvarez, C., O'Brien, N. M., et al. (2019). Functional protein rich extracts from bovine and porcine hearts using acid or alkali solubilisation and isoelectric precipitation. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 1292-1298, doi:10.1111/ijfs.14065.
- Zhao, X., Chen, X., Han, M.-y., Qian, C., Xu, X.-l., & Zhou, G.-h. (2016). Application of isoelectric solubilization/precipitation processing to improve gelation properties of protein isolated from pale, soft, exudative (PSE)-like chicken breast meat. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 141-148, doi:10.1016/j.lwt.2016.04.045.

ARTIGO II

Artigo redigido conforme a norma do periódico *Meat Science*
“Versão Preliminar”

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E TECNO-FUNCIONAL DE ISOLADOS
PROTEICOS OBTIDOS DE CORAÇÃO SUÍNO**

*Nutritional and technofunctional characterization of protein isolates obtained from porcine
heart*

Resumo

Este estudo teve como objetivo obter e caracterizar isolados proteicos de coração suíno (HIP), extraídos em solução aquosa (HIPaq) ou salina (HIPsal), adicionados ou não de nitrito de sódio, quanto as propriedades tecnológicas, funcionais e nutricionais. Os tratamentos não influenciaram o teor de proteína (89,03%) dos isolados, tendo os HIPsal maior proporção de proteínas sal-solúveis (53,79 vs 47,00%) e menor de proteínas insolúveis (19,22 vs 24,08%) do que os HIPaq. Os teores de pigmentos heme totais (707 µg hematina/g) e de colágeno (1,08 mg hidroxiprolina/g) não foram afetados pela solução de extração, mas foram maiores nas amostras tratadas com nitrito. A cor dos HIPsal era mais clara ($L^* = 73,3$ vs $56,0$) e menos intensa ($C^* = 30,5$ vs $34,5$) do que a dos HIPaq, mas a tonalidade ($h = 69,0^\circ$) não foi afetada pela solução de extração. O tratamento com nitrito reduziu os valores médios de h para $61,2^\circ$, tornando as amostras mais avermelhadas. Quanto as características tecno-funcionais, as capacidades de retenção de óleo e de absorção de água e a capacidade de emulsificação (CE) não foram afetadas pela solução de extração, mas a extração salina reduziu a estabilidade de emulsão (EE) e o tratamento com nitrito reduziu a CE e a EE dos isolados. Do ponto de vista nutricional, os isolados continham alto teor de ferro (165,85 mg/kg) e cálcio (53,73 mg/kg), com os HIPsal tendo maior teor de sódio e ferro-heme do que os HIPaq. Os HIP continham todos os aminoácidos essenciais (AAE) e com escores acima do requerido, exceto para valina no HIPsal. Foi observado um maior índice de AAE (160 vs 128) e eficiência proteica estimada (51 vs 41) nos HIPaq do que nos HIPsal. Os resultados indicam um alto potencial de uso dos HIP como ingredientes proteicos em produtos cárneos, devido as suas propriedades tecno-funcionais, ou como suplemento alimentar, especialmente devido à presença de grandes quantidades de ferro-

heme e de todos AAE. Para adição em dietas e suplementação alimentar, os melhores a serem adicionados são os HIPaq, já para a obtenção de funções tecnológicas, HIPsal ou HIPsal com nitrito.

Palavras-chave: Subproduto cárneo; solubilização isoelétrica; perfil de aminoácidos

1. Introdução

A carne suína está entre as mais consumidas no mundo. Em 2021, a sua produção alcançou mais de 48,85 milhões de toneladas na China, 23,68 milhões de toneladas na União Europeia (USDA, 2021) e 4,70 milhões de toneladas no Brasil (ABCS, 2021). Este aumento tem gerado um volume significativo de subprodutos do processo de abate nos frigoríficos, incluindo aqueles comestíveis designados no país como “miúdos”, em que se incluem alguns órgãos e partes do animal como: coração, fígado, rins, encéfalo, língua, estômago, pé, orelhas, máscara e rabo (Brasil, 2017). O coração suíno possui um grande valor nutricional, com elevado teor de proteínas (17-21%) de alto valor biológico, sendo fonte importante de aminoácidos essenciais (EAA) e não-essenciais (Mullen & Álvarez, 2016). No entanto, no Brasil estes órgãos ainda são pouco utilizados para o consumo in natura, em especial os de suínos, sendo muitas vezes subutilizados, destinados à elaboração de alimentos para animais de estimação, produtos farmacêuticos e cosméticos, fertilizantes, produtos cárneos processados ou à exportação (Costa, Paula, Massingue, Torres Filho, Ramos, & Carneiro, 2019; Paula, Buchili, Fontes, Ramos, & Ramos, 2022).

Além do ótimo valor nutricional, as proteínas dos órgãos podem apresentar excelentes funções tecnológicas, com propriedade emulsificante e gelificante conferidas por quantidades satisfatórias de proteínas quando comparadas com as da carne magra, auxiliando na capacidade de retenção de água e textura, principalmente quando em presença de sais e pHs ótimos de extração (Kim, Cheong, Yang, & Lee, 1991; Nuckles, Smith, & Merkel, 1990; Parés, Toldrà, Camps, Geli, Saguer, & Carretero, 2020; Tsermoula et al., 2019). Vários ingredientes proteicos, muitos derivados de fontes não cárneas, são comumente utilizados em produtos processados cárneos, como as proteínas vegetais (soja, em especial) do leite (soro, caseína, etc.) ou de ovos. Estas são usadas para atender requisitos tecnológicos como agentes extensores, ligantes, dentre outras funções tecno-funcionais. Desta forma, o desenvolvimento de novos ingredientes alimentícios, como concentrados e isolados proteicos, para fins de suplementos alimentares,

fortificantes (proteico e/ou de ferro), agentes extensores ou análogos de carne possuem um grande potencial do ponto de vista tecno-funcional (Anzani, Boukid, Drummond, Mullen, & Álvarez, 2020).

Além de existirem questões associadas à alergênicos para algumas fontes proteicas, proteínas de alto valor biológico como as da carne, podem também desempenhar um papel crucial na melhoria do estado nutricional de vários grupos de pessoas da sociedade, como idosos, grávidas e especialmente no combate à desnutrição (Parés et al., 2020; Reshan Jayawardena, Morton, Bekhit, Bhat, & Brennan, 2022). Ademais, é também importante considerar a atual preocupação com a demanda projetada por proteína no mundo, uma vez que, a população global deve chegar a 10 bilhões em 2050 e as projeções da FAO (2018) sugerem a necessidade de um aumento em quase 70% na produção/fornecimento de proteína para alimentação humana. Consequentemente, um aproveitamento e recuperação proteica eficiente de subprodutos também aumenta a rentabilidade da indústria. Assim, o desenvolvimento de técnicas eficientes de extração e concentração proteica tem ganhado atenção, uma vez que, é interessante do ponto de vista econômico e também para a minimização de desperdício e sustentabilidade (Costa et al., 2019; Mora, Toldrá-Reig, Reig, & Toldrá, 2019).

Apesar de alguns estudos já terem sido realizados visando a recuperação proteica de subprodutos do abate de suínos como em fígado (Costa et al., 2019; Steen et al., 2016), rim (Costa et al., 2019), pulmão (Lynch, Álvarez, O'Neill, Keenan, & Mullen, 2018; Selmane, Christophe, & Gholamreza, 2008), , baço (Toldrà, Parés, Saguer, & Carretero, 2019) e coração (Kim et al., 2017; Parés et al., 2020), até o presente momento não foi encontrado nenhum estudo que utilize ou avalie algum método para a estabilização e a atratividade da cor destes concentrados. Muitas vezes os consumidores relatam produtos contendo subprodutos cárneos como menos atraentes, com uma coloração enegrecida resultante da oxidação de grande quantidade de pigmentos heme (mioglobina e hemoglobina) presente (Costa et al., 2019).

Desta maneira, o nitrito de sódio (NaNO_2), já utilizado em formulações de produtos cárneos, seria uma alternativa para contornar o problema de cor, uma vez que estes interagem com os pigmentos heme, formando pigmentos nitrosos mais estáveis ao calor e de cor rósea atrativa (Ramos & Gomide, 2017a). Além disso, sais de nitrito são comumente utilizados em produtos cárneos como conservantes e por desempenhar funções importantes e distintas como agente de cor, sabor e aroma característicos dos produtos curados e como antioxidante no controle da oxidação lipídica (Dutra et al., 2017). Paula et al. (2022) empregaram o nitrito na extração de proteínas de fígado e coração suíno pela técnica de solubilização e precipitação

isoeletrica (ISP), avaliando soluções contendo sais de cloreto de sódio (NaCl) e de cloreto de magnésio (MgCl₂).

No entanto, posteriormente à extração, é também necessário melhorar a estabilidade e armazenamento dos extratos, á qual pode ser obtida através de processos de secagem. Além de transformar os produtos em pós, tornando mais fácil o manuseio e transporte, diversas técnicas de secagem vêm sendo aplicadas com sucesso em diferentes tipos de subprodutos cárneos, demonstrando forte potencial para o desenvolvimento de ingredientes à base de proteínas (Bishnoi, Khanna, Bishnoi, Tewari, Ghadwal, & Ahlawat, 2015; Jayawardena, Morton, Brennan, & Bekhit, 2019; Ohkuma et al., 2008; Toldrà, Parés, Saguer, & Carretero, 2020). Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi caracterizar isolados proteicos obtidos de coração suíno extraídos por diferentes soluções de extração, adicionados ou não de nitrito, quanto a composição centesimal, nutricional e funcional, para potencial uso como ingrediente alimentício.

2. Material e métodos

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Ciência e Tecnologia de Carnes e Derivados (LabCarnes) do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), da Escola de Ciências Agrárias de Lavras (ESAL), e no laboratório de Caracterização Físico-Química de Alimentos do Departamento de Nutrição (DNU), da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1. Obtenção dos isolados proteicos

As amostras de coração suíno (pH = 5,98; proteína = 20,03±0,15%; gordura = 3,59±0,50%; umidade = 74,33±0,66%; e cinzas = 1,27±0,31%) congeladas e embaladas a vácuo foram fornecidas, em três lotes distintos, por um frigorífico local (Nutrili, Lavras, Minas Gerais, Brasil) e transportadas para o Laboratório de Ciência e Tecnologia de Carnes (LabCarnes) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Os isolados proteicos de coração (HIP) foram obtidos pela técnica da precipitação isoeletrica avaliando a solução de extração, aquosa ou salina (4% de NaCl e 0,05% de MgCl₂), com ou sem adição de 0,2 mg/mL de nitrito de sódio (NaNO₂) na etapa de precipitação, conforme descrito por Paula et al. (2022). Assim, quatro tratamentos foram avaliados: 1) HIPaq,

extração aquosa; 2) HIPaq-N, extração aquosa + adição de nitrito; 3) HIPsal, extração em solução salina; e 4) HIPsal-N, extração em solução salina + adição de nitrito. Os valores de pH para as etapas de extração (solubilização) e de precipitação proteica também foram definidas em estudo anterior (Paula et al. (2022).

Os corações foram cortados em pedaços, pesados e homogeneizados nas soluções de extração (a 4 °C), na proporção de 1:5 (m/v), durante 10 min, utilizando um liquidificador industrial (marca, modelo, cidade, país). O pH dos extratos foi primeiramente ajustado (DM 20; Digimed São Paulo, Brasil) para 11, utilizando soluções de NaOH (0,2 M ou 1,0 M), para solubilização das proteínas. A solução homogeneizada foi mantida em repouso por 20 min sob refrigeração (4 °C) e, finalizada a solubilização, centrifugada (Hettich EBA 21; Hettich GmbH & Co.KG, Alemanha) a 3000×g por 15 min. A gordura em suspensão foi removida manualmente, com o auxílio de espátula e o sobrenadante filtrado em tecido de organza comercial. O pH do filtrado foi ajustado utilizando soluções de HCl (0,2 M ou 1,0 M), para valores próximos de 6,0, quando foi adicionado o nitrito de sódio nos tratamentos, e finalmente para 3,0, para a precipitação das proteínas em solução salina e para 5,0, em solução aquosa (ponto isoelétrico; PI), conforme descrito em (Paula et al. (2022). Uma vez ajustado o pH dos extratos no valor do PI, estes foram novamente centrifugados a 3000×g por 15 min para separação da fração proteica. O novo sobrenadante foi descartado e o precipitado proteico congelado em ultracongelador com sistema de ar estático (Coldlab, modelo CL120-86V, Piracicaba, SP, Brasil) a -75 °C, até posterior secagem.

As amostras congeladas foram liofilizadas (Edwards, modelo L4KR, São Paulo, Brasil; -40 °C, pressão de vácuo de 0,998 mbar) por 48h, refinadas em moedor de grãos (Hamilton Beach, EUA.), embaladas a vácuo (BD420; R.Baião, MG, Brasil), e armazenadas a temperatura ambiente até o momento das análises de caracterização.

Os HIP obtidos foram caracterizados quanto à composição centesimal e suas propriedades tecnológicas, funcionais e nutricionais. As propriedades tecno-funcionais de um concentrado proteico de soro (CPS) e um isolado proteico de soja (IPS) de marca comercial (New Max Industrial Ltda) também foram avaliados como referência, por estes serem extensores comumente utilizados na formulação de produtos cárneos no Brasil.

2.2. Caracterização tecnológica

2.2.1 Composição centesimal

A determinação da composição centesimal dos isolados obtidos e das proteínas de referência (CPS e IPS) foi realizada, segundo a metodologia oficial da AOAC (AOAC, 2012), sendo: umidade por secagem em estufa a 105 °C (método 925.45b); resíduo mineral fixo por incineração em mufla a 550 °C (método 923.03); proteínas, pelo método de microKjeldahl (método 960.52), utilizando o fator de 6,25; e extrato etéreo, pelo método de Soxhlet (método 920.39).

2.2.2 Fracionamento quanto a solubilidade proteica

As proteínas da carne são geralmente agrupadas em três categorias com base em sua solubilidade: 1) proteínas sarcoplasmáticas, que são solúveis em água ou em soluções de força iônica muito baixa; 2) proteínas miofibrilares, que são solúveis em soluções salinas com força iônica tão alta quanto 0,6 M; e 3) proteínas do estroma (ou do tecido conjuntivo) que permanecem insolúveis independentemente da força iônica da solução (Matak, Tahergorabi, & Jaczynski, 2015; Ramos & Gomide, 2017a). As proteínas dos HIP foram fracionadas quanto a sua solubilidade (1 - solúvel em água; 2 - solúvel em solução salina; e 3 - fração insolúvel), a partir de adaptações do procedimento descritos por Zhu et al. (2021). Cerca de 0,2 g do HIP foi pesado e adicionado de 10 mL de tampão com força iônica muito baixa (0,05 M KCl, 20 mM Tris-HCl; pH 7,5). A mistura foi homogeneizada (Ultra-Turrax TE-102; Tecnal Equipamentos Científicos, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por 2 min, mantida em repouso (a 4°C) por 60 min, e, então, centrifugada (Sigma 3K30; Laborzentrifugen, Alemanha) a 11.000×g por 20 min (a 4 °C). O precipitado foi lavado mais duas vezes com 10 mL de solução tampão. Os resíduos foram separados e o teor de proteínas (solúveis em água) no sobrenadante quantificado pelo método de Biureto. Os resíduos desta primeira extração foram, então, suspensos com 10 mL de tampão de média força iônica (0,6 M KCl, 20 mM Tris-HCl; pH 7,5), mantido em repouso (a 4 °C) por 18h e centrifugado a 11.000×g por 20 min (a 4 °C). O sobrenadante também foi separado e as proteínas (solúveis em solução salina) quantificadas pelo método de Biureto (Ramos & Gomide, 2017). O teor de proteínas insolúveis foi determinado por diferença, considerando o teor de proteína no HIP.

A quantificação das proteínas nas frações pelo teste de Biureto foi conduzida, segundo descrito por Ramos e Gomide (2017b). Brevemente, alíquotas de 1 mL das amostras foram

misturadas com 4 mL de reagente Biureto, homogeneizados, mantidos em repouso por 20 min em quarto escuro e a absorvância lida (Genesys 10 UV; Thermo Scientific Varian, São Paulo, Brasil) a 540 nm. O teor de proteína em solução foi determinado a partir de curva analítica obtida com albumina de soro bovino (BSA) e os valores expressos em g/100 g de proteína.

2.2.3 Eletroforese em gel

Os padrões eletroforéticos dos isolados foram obtidos usando gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema vertical de eletroforese (Mini-PROTEAN® Tetra Cell System; Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda, São Paulo, Brasil Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil). SigmaMarker™ (200 kDa a 6,5 kDa; Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado como marcador de peso molecular.

As amostras foram hidratadas em água ultrapura (4 mg/mL), diluídas (1:4) em um tampão desnaturante (62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 0,02% azul de bromofenol, 10% glicerol e 5% β -mercaptoetanol), e as proteínas desnaturadas em banho-maria a 90 °C por 10 min. Aproximadamente 10 μ L de amostra de proteína foram carregadas nos poços do gel de poli(acrilamida) (gel de separação 12 % e gel de empilhamento de 5 %) e submetidos a eletroforese em solução tampão Tris 25 mM (glicina 250 mM, EDTA 1 mM e SDS 10%) a uma voltagem inicial de 30 mV. Quando as proteínas penetraram no gel de separação, a voltagem foi ajustada para 100 mV e mantida até as proteínas atingirem o final do gel (Rodrigues, Guimarães, Ramos, Fontes, Ramos, & Ramos, 2022). Após a corrida, os géis foram mantidos em solução fixadora (metanol 48 % e ácido tricloroacético 10 %) por 24h, transferidos para uma solução corante (metanol 50%, ácido acético 10% e Comassie Brilliant Blue R250 0,25 %) e mantido por 24h. Os géis foram transferidos para uma solução clareadora (30% de metanol e 7% de ácido acético) e mantidos por 24h, quando foram removidos e fotografados para análise.

2.2.4 Teor de colágeno total

O teor de colágeno total foi determinado após digestão úmida de 1 g do isolado em 10 mL de ácido sulfúrico 7M a 105 °C por 16h. Logo após, o hidrolisado foi filtrado com carvão ativo e o volume completado para 100 mL. Uma alíquota de 2 mL foi adicionada para 1 mL de solução oxidante, permanecendo na ausência de luz por 20 min. Posteriormente, 1 mL de solução Ehrlich foi adicionada as soluções, misturadas, e mantidas em banho-maria por 15 min à 65 °C, no escuro, para a leitura em espectrofotômetro a 558 nm (Ramos & Gomide, 2017a).

O teor de colágeno total foi quantificado pela determinação do aminoácido hidroxiprolina (Bergman & Loxley, 1963).

2.2.5 Pigmentos heme totais

O teor de pigmentos heme totais (PHT) foi determinado por adaptação do método espectrofotométrico de hematina ácida proposto por Hornsey (1956) e descrito por Ramos e Gomide (2017a). Cerca de 1,0 g de isolado foram dissolvidos em 20 mL de solução de extração (acetona 78% e ácido clorídrico 3,15%), sendo os tubos tampados, agitados (vórtex) por 15s e armazenados (no escuro e à temperatura ambiente) por 60 min. Os extratos obtidos foram centrifugados a 3000×g por 10 min e os sobrenadantes foram filtrados, sendo a absorvância medida a 640 nm contra um branco de reagente. A concentração de PHT nos isolados foi expresso em µg de hematina/g de amostra, considerando 652 como a massa molecular e 4,80 cm²/µmol como coeficiente de extinção da hematina ácida.

2.2.6 Teor de nitrito residual

O teor de nitrito residual (NO₂R) foi determinado, segundo adaptações do protocolo AOAC n° 973.31 (AOAC, 2012) descritos por Guimarães et al. (2021). Cerca de 5 g do isolado foram adicionados de 40 mL de água destilada quente (80 °C), e a mistura mantida em banho-maria por duas horas à 80 °C para extração. Posteriormente, a mistura ainda quente foi filtrada para um balão de 250 mL e o volume completado com água destilada. Em um tubo de ensaio envolto em papel alumínio, uma alíquota de 2 mL do filtrado foi misturada a 1 mL de água destilada e 0,2 mL de solução sulfanilamida 1% (em ácido clorídrico 0,5 M), sendo agitado e o tubo mantido em repouso, no escuro e à temperatura ambiente, por 5 min. A mistura foi, então, transferida para um balão volumétrico de 10 mL, sendo adicionado 0,2 mL de solução N-(1-naftil) etilenodiamina hidrocloreto (NED) 0,1% e o volume completado. A nova mistura foi novamente mantida por 15 min, no escuro e à temperatura ambiente, antes da leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Os teores de NO₂R foram determinados por curva analítica de nitrito de sódio (NaNO₂), e os valores expressos em mg NO₂/kg.

2.2.7 Cor instrumental

A avaliação da cor foi conduzida utilizando-se um espectrofotômetro portátil CM-700 (Kônica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japão), padronizado para leitura em porta de 8 mm, com o iluminante D65 e ângulo de 10° para o observador e luz especular incluída *excluída (SCE).

Os isolados foram dispostos em placas de Petri (obtendo uma altura padronizada de 1 cm), e a leitura realizada em três partes distintas da superfície, com o conjunto disposto sob uma superfície branca, sendo os índices CIELAB (L^* = luminosidade; a^* = índice de vermelho; e b^* = índice de amarelo) e as coordenadas angulares de saturação (C^*) e ângulo de tonalidade (h , graus) registradas. A diferença global de cor da CIE (ΔE^*) entre os isolados HIP foi calculado pela Equação 1, enquanto o índice de “brancura” (whiteness; W^*), de todos isolados (incluindo as referências), calculada pela Equação 2 (Park, Brewer, Novakofski, Bechtel, & McKeith, 1996).

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (\text{Eq.1})$$

$$W^* = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{Eq.2})$$

Em que L^* , a^* e b^* são as coordenadas de cor da CIE para a amostra a ser avaliada e L_0^* , a_0^* e b_0^* as coordenadas da amostra de referência (HIPaq ou HIPsal).

2.3 Propriedades tecno-funcionais

2.3.1 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água (CRA) foi avaliada, segundo metodologia descrita por da Costa, Paula, Massingue, Torres Filho, Ramos, e Carneiro (2019). Um grama do isolado proteico foi adicionado de 25 mL de tampão fosfato (0,1 M; pH 6,5) em tubo de centrífugapreviamente tarado. O tubo foi agitado (Agitador modelo 109, Nova Ética, SP) por 5 min e, posteriormente, centrifugado a $3000 \times g$ por 20 min. A água foi removida cuidadosamente do tubo, o precipitado pesado e o resultado expresso como a massa de água retida pela massa de proteína total presente na amostra (g/g proteína).

2.3.2 Capacidade de retenção de óleo

A capacidade de retenção de óleo (CRO) foi avaliada, segundo metodologia descrita por Fonkwe and Singh (1996), citada por Chevalier, Pizato, de Lara, and Cortez-Vega (2018). Um grama do isolado foi adicionado de 20 mL de óleo vegetal de canola em tubo de centrífuga previamente tarado. O tubo foi agitado por 10 min e centrifugado a $3000 \times g$ por 20 min. O óleo foi removido cuidadosamente do tubo, o precipitado pesado e o resultado expresso em massa

de óleo retido pela massa de proteína total presente na amostra (g/g proteína).

2.3.3 Capacidade emulsificante

A capacidade emulsificante (CE) foi determinada, segundo o método descrito por Okezie and Bello (1988). Um grama de proteína foi homogeneizado com 34 mL de solução de cloreto de sódio 3% e a mistura mantida sob agitação (em agitador mecânico), adicionando-se óleo de canola através de uma bureta até a formação de emulsão, determinada pela dispersão do óleo sobre a proteína diluída, não havendo mistura. A capacidade emulsificante foi determinada como o volume de óleo gasto para formar a emulsão pela quantidade total de proteína (mL óleo/g).

2.3.4 Índices de atividade emulsificante e de estabilidade da emulsão

Os índices de atividade emulsificante (IAE) e de estabilidade da emulsão (IEE) dos isolados foram determinados pela técnica da turbidez, descrita por Chatterjee, Dey, Ghosh, e Dhar (2015), com algumas modificações. Aproximadamente 60 mg do isolado foram dispersos em 6 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 7,0) e, após agitação por 30 min à temperatura ambiente, 2 mL de óleo de soja foi adicionado e a mistura homogeneizada a 14.000 rpm até formar uma emulsão homogênea (~ 60s). Uma alíquota de 50 µL da emulsão (do fundo do tubo) foi retirada, diluída em 5 mL de solução SDS 0,1%, misturado (vórtex) e a absorvância imediatamente medida a 500 nm. Após 10 min de repouso, outros 50 µL de emulsão foram misturados com 5 mL de solução SDS 0,1%, e a absorvância a 500 nm novamente medida. Os índices IAE e IEE foram determinados pelas Equações 3 e 4, respectivamente.

$$IAE (m^2/g) = \frac{2 \times 2,303 \times A_0}{\theta \times P_a} \quad (\text{Eq.3})$$

$$IEE (\text{min}) = A_0 \times \frac{10}{A_0 - A_{10}} \quad (\text{Eq.4})$$

Em que A_0 e A_{10} são as absorvâncias imediatamente após a formação de emulsão e depois de 10 min, respectivamente, θ é a fração volumétrica de óleo na emulsão e P_a é o peso (g) da proteína na emulsão.

2.4 Caracterização nutricional

A caracterização nutricional foi feita apenas nos isolados proteicos de coração obtidos

por solução aquosa (HIPaq) e por solução salina (HIPsal), sem adição de nitrito.

2.4.1 Teor de minerais

Os minerais cálcio (Ca), ferro (Fe), potássio (K), sódio (Na) e fósforo (P) foram quantificados por fotometria de chama após digestão úmida, conforme descrito por Paula, Haddad, Rodrigues, Júnior, Ramos, and Ramos (2019). Brevemente, 2 g de amostra foram pesados em tubos digestores, adicionados de 8 mL de ácido nítrico concentrado e 2 mL de ácido perclórico 70% e digeridos a 90 °C, até a obtenção de uma solução límpida. As amostras digeridas foram diluídas para 50 mL com água deionizada, em um balão volumétrico, e a leitura realizada em um fotômetro de chama B262 (Micronal, São Paulo, São Paulo, Brasil).

O teor de ferro-heme (mg/kg), ferro orgânico altamente biodisponível, também foi avaliado a partir dos resultados da determinação de hematina ácida (PHT; item 2.2.5), considerando como massa molecular 55,85 para o ferro e 652 para a hematina ácida.

2.4.2 Perfil de aminoácidos

A análise de aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando um cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão). As amostras foram hidrolisadas (fenol 3% em HCl 6 M) por 24h a 110 °C, seguida de derivatização em pré-coluna com isotiocianato de fenila. Os aminoácidos foram separados em fase reversa usando uma coluna Luna C-18 (100 Å, 5 µm, 250 × 4,6 mm; Phenomenex, Torrance, CA) a 50°C e quantificados usando um detector de UV a 254 nm (Hagen, Frost, & Augustin, 1989). Os resíduos de triptofano foram determinados após hidrólise alcalina (hidróxido de bário 4 M), de acordo com a metodologia proposta por Lucas e Sotelo (1980).

Com base no perfil de aminoácidos, o escore químico de cada aminoácido essencial (AAES), expresso como uma porcentagem dos valores de aminoácido padrão requeridos, e o índice de aminoácidos essenciais (IAAE) foram calculados pelas Equações 5 e 6 (FAO/WHO,2007Alsmeyer, RH, AE, and ML (1974).

$$AAES (\%) = 100 \times \frac{AAE_A}{AAE_R} \quad (\text{Eq.5})$$

$$IAAE (\%) = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n AAES_i} \quad (\text{Eq.6})$$

Em que AAE_A e AAE_R são o teor (mg/g de proteína) do aminoácido essencial encontrado no

isolado e no padrão de referência (aminoácidos requeridos) da FAO/WHO (2007), respectivamente, e n é o número de aminoácidos considerados para o cálculo (9 AAE; o par fenilamina + tirosina foi contando como 1).

Os valores da razão de eficiência proteica (PER) dos isolados também foram estimados pela Equação 7 (Alsmeyer et al., 1974), considerando os aminoácidos metionina (Met), leucina (Leu), histidina (Hys) e tirosina (Tyr).

$$PER = - 1,816 + 0,435 \times \text{Met} + 0,780 \times \text{Leu} + 0,211 \times \text{His} - 0,944 \times \text{Tyr} \quad (\text{Eq.7})$$

2.5 Análise estatística

Os dados foram avaliados por delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo os efeitos dos isolados testados pela análise de variância (ANOVA), considerando um nível de significância de 5%. O teste de múltiplas faixas de Duncan foi usado para determinar as diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias. Todas as análises experimentais foram realizadas em triplicata. Para o conteúdo de minerais e perfil de aminoácidos totais, os dados foram avaliados por análise descritiva. As análises estatísticas foram realizadas no software Statistica® 8.0 (StatSoft, Polônia).

3. Resultados e discussão

3.1. Composição e características tecnológicas

A caracterização dos isolados de coração (HIP) extraídos em soluções aquosa (HIPaq) ou salina (HIPsal), com ou sem adição de nitrito de sódio, assim como das proteínas de referência, está descrita na Tabela 1. De maneira geral, quanto à composição centesimal, a proteína foi o componente majoritário dos HIP em sua composição. Teores baixos de gordura e cinzas podem ser atribuídos ao efeito de solubilização e ao arrasto da gordura para a fase líquida durante as etapas de centrifugação e lavagem no processo de recuperação de proteína.

Tabela 1. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) e dos tratamentos (com e sem adição de nitrito) na composição (média \pm desvio padrão) de isolados de coração suíno (HIP) obtidos por precipitação isoeletrica.

Características	Extração aquosa		Extração salina		Proteínas de referência	
	HIPaq	HIPaq-N	HIPsal	HIPsal-N	IPS	CPS
Umidade (g/100g)	7,07 \pm 1,46 ^a	7,00 \pm 0,58 ^a	6,08 \pm 0,75 ^{ab}	6,42 \pm 0,13 ^{ab}	5,15 \pm 0,63 ^b	9,71 \pm 0,82 ^c
Gordura (g/100g)	0,50 \pm 0,19 ^a	0,56 \pm 0,05 ^a	0,49 \pm 0,22 ^a	0,65 \pm 0,11 ^a	0,29 \pm 0,06 ^a	1,09 \pm 0,29 ^b
Cinzas (g/100g)	3,28 \pm 0,38 ^a	3,99 \pm 0,20 ^{ab}	5,27 \pm 0,90 ^{cd}	4,87 \pm 0,63 ^{bc}	3,88 \pm 0,42 ^{ab}	6,21 \pm 0,71 ^d
Proteína (g/100g)	88,96 \pm 1,58 ^a	87,45 \pm 4,42 ^a	90,25 \pm 4,37 ^a	89,45 \pm 1,70 ^a	89,57 \pm 2,82 ^a	70,44 \pm 1,76 ^b
Fração solúvel em água (g/100g proteína)	29,23 \pm 2,59 ^a	28,60 \pm 6,06 ^a	28,00 \pm 0,78 ^a	25,97 \pm 0,97 ^a	15,98 \pm 0,27 ^b	42,02 \pm 1,35 ^c
Fração solúvel em sal (g/100g proteína)	46,21 \pm 2,73 ^a	47,78 \pm 5,33 ^a	53,50 \pm 1,18 ^b	54,08 \pm 1,13 ^b	10,49 \pm 0,29 ^c	18,42 \pm 1,09 ^d
Fração insolúvel (g/100g proteína)	24,56 \pm 5,19 ^a	23,61 \pm 1,65 ^a	18,49 \pm 0,59 ^b	19,95 \pm 0,9 ^b	73,53 \pm 0,42 ^c	39,56 \pm 2,19 ^d
Pigmento Heme Total, PHT (μ g hematina/g)	685,5 \pm 70,63 ^a	848,97 \pm 24,46 ^b	729,64 \pm 121,21 ^{ab}	994,2 \pm 25,23 ^d	-	-
Colágeno (mg hidroxiprolina/g)	1,06 \pm 0,02 ^a	1,25 \pm 0,03 ^b	1,08 \pm 0,01 ^a	1,32 \pm 0,05 ^b	-	-
Nitrito Residual, NO ₂ R (mg/kg)	<i>nd</i>	160,68 \pm 0,22	<i>nd</i>	157,07 \pm 0,48	-	-

HIPaq-N e HIPsal-N = solução de extração com adição de nitrito de sódio; IPS =isolado proteico de soja; CPS =concentrado proteico de soro; e *nd* =não detectado.

^{a-d} Médias, na linha, seguidas de letras diferentes diferem (P < 0,05) pelo teste de Duncan.

Os valores de umidade dos HIP foram iguais ($P > 0,05$), independentemente se tratados ou não com nitrito. Em relação às referências, a umidade das amostras em solução aquosa foi maior ($P < 0,05$) do que o isolado proteico de soja (IPS), que não diferiu das amostras extraídas em solução salina. Já o concentrado proteico de soro (CPS) apresentou valores para a umidade maiores ($P < 0,05$) do que os HIP.

Costa et al. (2019), ao analisarem concentrados proteicos de subprodutos de suínos secos por liofilização, encontraram valores médios relativamente maiores para a umidade, sendo de 8,88% no coração, 8,54% no fígado e 13,14% no rim. Já Long and Mohan (2021), utilizando o método de secagem por *spray drying* para língua bovina, alcançaram teores de 3,9%. De maneira similar, Reshan Jayawardena et al. (2022), utilizando a mesma técnica para secar pulmão bovino, relataram teores de umidade entre 0,40 a 4,79% para os concentrados obtidos. Desta forma, os teores de umidade encontrados neste estudo, foram intermediários aos encontrados na literatura para concentrados ou pós de subprodutos cárneos, sendo este ponto favorável a sua utilização no aspecto de armazenamento e vida útil.

O teor de gordura dos HIP não diferiu ($P > 0,05$) para nenhum dos tratamentos, com média de $0,55 \pm 0,14$, e também foi semelhante ($P > 0,05$) ao do IPS, diferindo ($P < 0,05$) apenas do CPS, que apresentou um teor lipídico mais elevado. Tsermoula et al. (2019) encontraram valores próximos de 0,37% de gordura, em extratos proteicos de coração suíno precipitados por solubilização alcalina (pH 11,0).

O teor de cinzas apresentou efeito ($P < 0,05$) do tipo de extração e da adição ou não de nitrito de sódio. Os isolados adicionados com nitrito não diferiram ($P > 0,05$) entre si, independente da solução de extração utilizada, com teor de cinzas semelhante ao encontrado para o IPS. No entanto, o CPS e o HIPsal apresentaram teores de cinza maiores ($P < 0,05$) quando comparados aos HIPaq. O maior teor de cinzas observado para os isolados extraídos com solução salina pode ser devido à adição do sal na etapa de extração, com consequente acréscimo mineral, da mesma forma que o CPS também é fonte deste composto oriundo de sua matéria-prima. Resultados semelhantes foram observados por Toldrà et al. (2019), ao extraírem proteínas de baço suíno, utilizando diferentes concentrações de sal. Os autores observaram maiores teores de cinzas (4,08-4,42%) ao aumentarem a força iônica do tampão de extração, em 3,42-4% de NaCl.

O teor de proteína total dos HIP não foi afetado ($P > 0,05$) pelos tratamentos, sendo igual ao teor proteico do IPS, porém maiores ($P < 0,05$) do que o CPS. A legislação brasileira preconiza diferenças, inclusive para nomenclatura, com base na composição de produtos

proteicos vegetais. Três grandes grupos podem ser divididos quanto à composição de proteína: farinha ou proteína texturizada (50-65%), concentrado proteico (65-90%) e isolado proteico (> 90%) (FAO, 1992; BELLOQUE et al., 2002; BRASIL, 2005). Desta forma, os extratos secos de coração suíno obtidos neste estudo se aproximaram da composição do isolado proteico de soja, utilizado como referência.

Para as frações proteicas, as solúveis em água não apresentaram efeito ($P > 0,05$) quanto aos tratamentos utilizados, exibindo todas as amostras de isolados de coração concentrações iguais. Como esperado, a fração de proteínas sal-solúveis foi maior ($P < 0,05$) nos HPIsal do que nos HPIaq e, de forma inversa, a proporção de proteínas insolúveis foi menor. Esta diferença encontrada, provavelmente ocorreu devido à força iônica do meio, solubilizando mais proteínas (Chen, Tume, Xu, & Zhou, 2017). Para a grande maioria das proteínas, em especial as miofibrilares, até 4% de sal (força iônica intermediária) promove aumento da sua solubilidade. Este fato é denominado *salting-in*, resultante do efeito do sal sobre as interações eletrostáticas, estabilizando os grupos com cargas na superfície das proteínas, ocorrendo assim uma mudança no PI, com o aumento da capacidade de ligação da água (Fennema, Damodaran, & Parkin, 2017). Desta maneira, tal resultado confirma que, uma quantidade considerável desta fração foi recuperada nos processos através do aumento da força iônica com a utilização de soluções salinas na etapa de extração (Hrynets, Omana, Xu, & Betti, 2011; Matak et al., 2015).

Em relação as referências (CPS e IPS), os HIP apresentaram maiores ($P < 0,05$) concentrações para as frações solúveis em água em relação ao IPS. No entanto, o CPS foi a proteína mais ($P < 0,05$) solúvel em água observada. Para as sal-solúveis, todas as amostra de HIP apresentaram maiores ($P < 0,05$) proporções desta fração em relação às proteínas comerciais. E, para as insolúveis, o IPS mostrou uma maior ($P < 0,05$) fração, comparada às demais, diminuindo conseqüentemente a proporção em relação às outras frações encontradas.

Toldrà et al. (2020), ao extraírem proteínas de baço suíno, alcançaram valores médios de 63,55% de proteínas solúveis e 24,72% de proteínas insolúveis em extrato de baço pasteurizado a 85°C. Costa et al. (2019) também encontraram maiores teores proteicos em frações solúveis liofilizadas de coração e fígado de suíno, com valores médios de 77,30% e 73,48%, respectivamente. Darine, Christophe, e Gholamreza (2010), ao purificarem pulmões de suíno e bovino, obtiveram valores médios de 78 e 77 g/100 g de proteína total, respectivamente.

Costa et al. (2019) obtiveram isolados proteicos de coração suíno por extração em solução aquosa e encontraram maiores frações proteicas solúveis em água (180 mg/g) do que solúveis em sal (159 mg/g). Com soluções salinas, provavelmente mais proteínas são extraídas em

comparação com água destilada, resultando em proteínas solúveis em água mais baixas e solúveis em sal mais elevadas, o que foi comprovadamente demonstrado neste trabalho.

Para complementar, o eletroforetograma SDS-PAGE das diferentes frações proteicas dos isolados proteicos de coração suíno estão representados na Figura 1. De forma geral, os principais componentes dos HIP foram peptídeos de 55 e 36 kDa, que correspondiam à cadeia leve de actina e miosina, respectivamente. Embora também fosse esperado a detecção da cadeia pesada de miosina, em 200 kDa, Kim et al. (2017), em seu estudo com coração, reportaram que esta proteína poderia ter sido gradualmente degradada à medida que o tempo de extração proteica aumentou, o que pode, de modo similar, ter ocorrido neste estudo. Além disso, a extração em soluções salinas implicou em uma maior degradação de peptídeos dos isolados na eletroforese. As intensidades das bandas foram sempre maiores para as amostras de HIPsal, tornando-se mais pálidas à medida que a extração das proteínas foi realizada em solução aquosa.

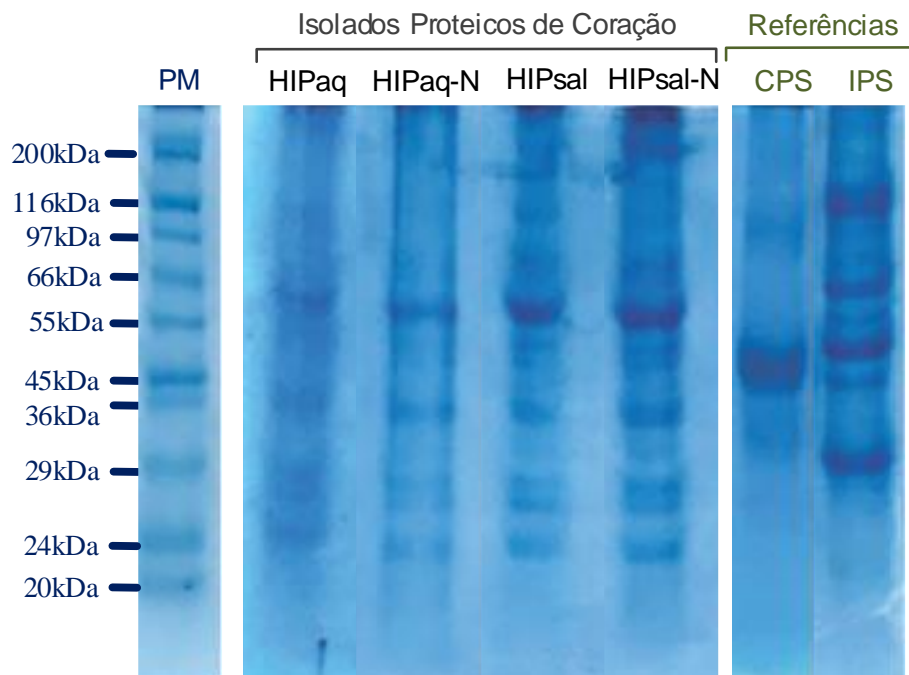


Figura 1. Perfil representativo das proteínas (separados em gel SDS-PAGE 10%) dos isolados proteicos de coração suíno obtido por diferentes soluções de extração: HIPaq e HIPaq-N = extração em solução aquosa sem e com adição de NaNO_2 (0,2 mg/mL), respectivamente; e HIPsal e HIPsal-N = extração em solução salina (NaCl 4%, MgCl_2 0,05%) sem e com adição de NaNO_2 (0,2 mg/mL), respectivamente. PM = Padrão molecular de 20 a 200 kDa.

Segundo Nuckles et al. (1990), proteínas miofibrilares, actina e miosina, apresentam frações proteicas com maior solubilidade em presença de soluções salinas. Com a utilização de força iônica, acredita-se que a estrutura miocárdica possa ser enfraquecida pela permeação de sais, facilitando a liberação de proteínas solúveis (Kim, Kim, Kim, Jung, Lee, & Song, 2018). Além disto, segundo Shen, Swartz, Wang, Liu, Gao, and Zhang (2016), a adição de sal como o NaCl interfere nas interações entre os domínios dos bastonetes de miosina, colaborando em processos de recuperação proteica de subprodutos cárneos.

Desta forma, a principal diferença entre as amostras está entre a maior degradação para o perfil de proteínas miofibrilares obtidas na extração salina, presumivelmente, podendo ser atribuída à diferente força iônica. Tal resultado corrobora com a maior fração de proteínas sal-solúveis identificada para estes tratamentos também neste trabalho (Tabela 1). De maneira semelhante, Parés et al. (2020), em seu estudo com extratos de corações suínos utilizando diferentes pHs e força iônica, avaliaram o seu eletroforetograma SDS-PAGE e observaram que a solubilidade proteica das proteínas sal-solúveis (miosina e actina G) foram sempre favorecidas pelas condições de extração, que combinavam pH elevado, distante do ponto isoelétrico, juntamente com alta força iônica. De modo geral, os autores obtiveram um perfil representativo de proteínas bem próximo ao encontrado neste trabalho. Tsermoula et al. (2019), ao extraírem proteínas de coração suíno e bovino com uso de solubilização ácida e alcalina, encontraram como proteínas predominantes a miosina e actina, utilizando gel SDS-PAGE 5% para todas as amostras, independentemente do tipo de precipitação utilizada.

Outro peptídeo, na faixa de 116 kDa, foi levemente observado, especialmente, para a amostra HIPsal, sendo este associado à moléculas de tropocolágeno (Parés et al., 2020). O tropocolágeno compõe as fibras de colágeno (frações insolúveis), juntamente com a elastina (Gomide, Ramos, & Fontes, 2013). Na faixa de 66 kDa, também foram identificadas outras frações proteicas, provavelmente correspondendo a proteínas do sangue, albumina (PM 66–70 kDa), proteína sarcoplasmática globular mais abundante no plasma. Proteínas sarcoplasmáticas são proteínas solúveis em água, consistindo principalmente de enzimas e pigmentos heme (Steen et al., 2016). Além disso, pode-se observar que, assim como representado em todo o gel, as bandas foram um pouco mais acentuadas para as amostras extraídas em solução salina.

Em relação as proteínas de referência, através da eletroforese também foi possível observar um peptídeo para o CPS em 45 kDa, sendo este relacionado às bandas de lactoferrina e imunoglobulina, identificadas anteriormente por Havea, Singh, Creamer, and Campanella (1998); (Roufik, Paquin, & Britten, 2005). Também para o IPS, já com bandas mais

demarcadas, pode-se associar de 97 a 55 kDa frações de globulina, aglutinina (45 a 35 kDa) e em torno de 29 kDa, também foi possível observar bandas que são associadas ao inibidor da enzima tripsina, a tripsinase. (Petruccelli & Anon, 1995; STEPHAN, 2008).

Assim, de maneira geral, com a utilização da eletroforese foi possível identificar as principais frações proteicas presente para os HIP e também para as referências. E, embora o SDS-PAGE, como realizado neste estudo, não possa ser considerado um método quantitativo, foi demonstrado que diferenças nos perfis de polipeptídios podem estar relacionadas às técnicas de extração (Aluko & McIntosh, 2001).

Para o teor de pigmentos heme totais (PHT), uma fração das proteínas solúveis não houve efeito ($P > 0,05$) do tipo de extração, entretanto, o tratamento com nitrito aumentou a extração destes pigmentos, especialmente quando em solução salina. O óxido nítrico (NO), formado a partir da adição do nitrito, reage facilmente com o ferro, especialmente o ferro heme dos pigmentos (mioglobina ou hemoglobina) (Honikel, 2008; Pegg & Shahidi, 2008). Conseqüentemente, ao se ligar, ocorre uma maior solubilidade da molécula, além de maior estabilidade contra oxidação e desnaturação proteica (Livingston & Brown, 1981), o que pode ter diminuído a perda de pigmentos heme em relação às amostras que não foram tratadas com nitrito.

De maneira similar aos pigmentos, para o colágeno total também foi verificada uma maior ($P < 0,05$) concentração para os HIP tratados com nitrito em relação aos não tratados. Provavelmente, o nitrito pode ter interagido com compostos presentes na molécula de colágeno, como resíduos de aminoácidos. O NO também pode reagir com grupos SH em aminoácidos, como a cisteína ou glicina (Honikel, 2008; Pegg & Shahidi, 2008), presentes na molécula de colágeno. Portanto, ao se ligarem, os tratamentos com nitrito diminuiram a sua solubilização, aumentando a concentração.

A concentração de nitrito residual (NO_2R) não foi afetada ($P > 0,05$) pelas duas soluções de extração utilizadas na obtenção dos HIP. No entanto, o seu teor é um parâmetro importante de controle, especialmente quando os HIP forem utilizados em produtos cárneos, conseqüentemente, devendo ser considerada a adição de nitrito oriunda do isolado proteico na formulação.

O estabelecimento da cor é o primeiro e mais evidente efeito do nitrito quando adicionado à carne e seus subprodutos e, especificadamente neste estudo, foi aplicado com o objetivo de tornar a cor dos isolados proteicos mais atrativa e estável. De forma geral, a cor dos isolados foi afetada tanto pela solução de extração quanto pela adição de nitrito (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) e dos tratamentos (com e sem adição de nitrito) na cor (média \pm desvio padrão) de isolados de coração suíno (HIP) obtidos por precipitação isoelétrica.

Índices de cor	Extração aquosa		Extração salina		Proteínas de referência	
	HIPaq	HIPaq-N	HIPsal	HIPsal-N	IPS	CPS
Luminosidade, L^*	56,02 \pm 2,19 ^a	51,61 \pm 1,76 ^a	73,31 \pm 1,82 ^b	65,29 \pm 0,49 ^c	86,86 \pm 3,35 ^d	82,29 \pm 2,37 ^d
Índice de vermelho, a^*	13,10 \pm 0,51 ^a	15,04 \pm 1,90 ^a	10,28 \pm 1,02 ^b	9,74 \pm 0,70 ^b	4,85 \pm 0,60 ^c	9,66 \pm 0,25 ^b
Índice de amarelo, b^*	31,93 \pm 0,68 ^a	26,37 \pm 0,72 ^b	28,73 \pm 2,25 ^b	18,36 \pm 2,24 ^c	16,67 \pm 0,37 ^d	28,98 \pm 1,53 ^b
Saturação, C^*	34,52 \pm 0,82 ^a	30,36 \pm 0,33 ^b	30,51 \pm 2,45 ^b	20,79 \pm 1,77 ^c	17,37 \pm 0,51 ^d	30,54 \pm 1,53 ^b
Ângulo de tonalidade, h ($^\circ$)	67,69 \pm 0,39 ^a	60,30 \pm 3,81 ^b	70,31 \pm 0,47 ^a	62,05 \pm 3,96 ^b	73,77 \pm 1,65 ^c	71,56 \pm 0,48 ^{ac}
Diferença global da cor, ΔE^*	-	7,36 \pm 1,01 [†]	17,81 \pm 0,84 [‡]	13,12 \pm 1,98 [†]	-	-
Índice de “brancura”, W^*	44,09 \pm 1,28 ^a	42,88 \pm 1,63 ^a	59,46 \pm 0,56 ^b	59,54 \pm 1,36 ^b	78,23 \pm 1,93 ^c	64,69 \pm 2,54 ^d

HIPaq-N e HIPsal-N = solução de extração tratada com nitrito de sódio; IPS =isolado proteico de soja; CPS =concentrado proteico de soro; e *nd* =não detectado.

[†]Diferença em relação à amostra controle (HIPaq ou HIPsal, sem adição de nitrito).

[‡]Diferença em relação à amostra HIPsal.

^{a-d}Médias, na linha, seguidas de letras diferentes diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Os HIP extraídos em solução aquosa tinham um mesmo tom de cor (valor h), porém mais escuro (menor valor de L^*) e intenso (maior valor de C^*) do que aqueles extraídos em solução salina. Além disso, a utilização de nitrito auxiliou na tonalidade avermelhada (redução do h) dos isolados, reduzindo a intensidade da cor e, nos extraídos em solução salina, reduzindo também a sua luminosidade (Figura 2).

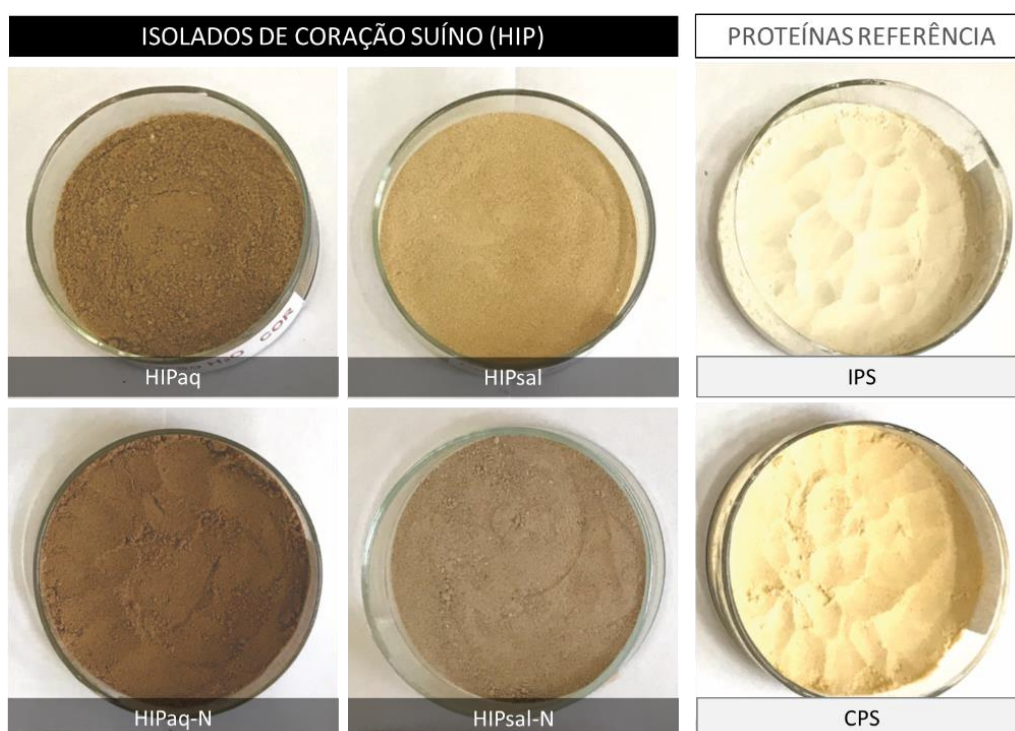


Figura 2. Fotografia dos isolados proteicos de coração suíno e proteínas de referência. HIPaq e HIPaq-N = extração em solução aquosa sem e com adição de NaNO_2 (0,2 mg/mL), respectivamente; HIPsal e HIPsal-N = extração em solução salina (NaCl 4%, MgCl_2 0,05%) sem e com adição de NaNO_2 (0,2 mg/mL), respectivamente; IPS = isolado proteico de soja; e CPS = concentrado proteico de soro de leite.

Brevemente, para o parâmetro de luminosidade (L^*), os tratamentos extraídos em solução aquosa foram mais escuros ($P < 0,05$) do que aqueles extraídos em solução salina. Já as referências comerciais, diferiram ($P < 0,05$) de todas as amostras de isolado de coração suíno, demonstrando-se mais claras. Além disso, a brancura das amostras também foi avaliada. Menores valores foram encontrados para os tratamentos em solução aquosa ($P < 0,05$) diferindo-os dos demais, o que parece estar relacionado aos menores valores de L^* (amostras mais escuras) observado nestas amostras. Além disto, os maiores ($P < 0,05$) valores observados

para as referências comerciais em relação aos HIP, confirmam como estas são mais claras (Figura 2), fator associado a ausência de pigmento em sua composição.

Quanto ao índice de vermelho (a^*) e índice de amarelo (b^*), a extração em água aumentou ($P < 0,05$) o a^* para todos os tratamentos nestas soluções, e também o b^* para o controle, em relação aos demais. Entretanto, sabe-se que, a cor é um atributo tridimensional, descrita pela luminosidade (L^*), saturação (C^*) e tonalidade (h^*), sendo que na avaliação instrumental da cor as coordenadas angulares (C e h^*) são determinadas pelos índices de cromacidade (Massingue et al., 2019; Ramos & Gomide, 2017a). Assim, a variação nos valores de a^* e b^* muitas vezes não descrevem adequadamente as diferenças na cor dos produtos. Desta forma, para a saturação (C^*), o tratamento controle do isolado de coração em solução aquosa também apresentou uma cor mais intensa ($P < 0,05$) (maior valor de C^*), em relação as outras amostras, justificando os maiores valores encontrados de a^* e b^* .

Já para o ângulo de tonalidade, que descreve o tom da cor, pode-se observar que, as amostras HIP não tratadas com nitrito, juntamente com as referências comerciais, apresentaram maiores valores para h^* ($P < 0,05$) quando comparados com os isolados tratados com nitrito, independente da solução de extração utilizada. O aumento do ângulo de tonalidade é um indicativo de descoloração da cor vermelha do pigmento heme, que se aproxima da região laranja, refletindo em um tom mais alaranjado, e menos vermelho das amostras. Dutra et al. (2017) e Guimarães et al. (2021) reportaram que maiores adições de nitrito implicam em menores valores de h^* em produtos cárneos, o que corresponde a uma amostra mais avermelhada. De maneira similar para a proteína isolada, pode-se observar que houve um comportamento semelhante, quando tratados com nitrito, com uma tonalidade próxima a rósea/avermelhada sendo conferida.

Toldrá et al. (2020), ao avaliarem a cor nas duas frações do concentrado obtido de proteína de baço suíno, relataram que, a fração solúvel apresentava coloração vermelho-rosada e a insolúvel amarelo ocre. De maneira similar, Toldrá et al. (2019), ao utilizarem tampão de extração com pH 5,0 (precipitação), observaram que para esta faixa foi favorecida a solubilização de pigmentos heme, levando a um resíduo insolúvel menos colorido. Tais resultados podem ser associados aos encontrados neste estudo. Os isolados proteicos de coração foram obtidos por precipitação isoeletrica, em pHs mais baixos, tornando-os assim menos colorido. No entanto, quando tratados com nitrito, um tom mais avermelhado, próximo da cor curada foi observado, independente da solução de extração utilizada. Por fim, através do cálculo de diferença (ΔE^*) para a cor (Tabela 2), foi possível observar as proximidades entres as

amostras. A cor do controle em solução salina foi bem mais distante em comparação com o controle aquoso, comprovando o que nitidamente pode ser observado na Figura 2. Além disso, os isolados em solução salina, apresentaram uma maior diferença quando tratados de nitrito, em relação ao extraídos em água e tratados com nitrito.

3.2. Propriedades tecno-funcionais

As propriedades técnico-funcionais dos isolados de coração suíno obtidos e das proteínas de referência estão descritas na Tabela 3.

A capacidade de retenção de água e óleo é a propriedade de uma proteína em adsorver água/óleo dentro de sua estrutura. Além disso, estas capacidades em uma proteína estão relacionadas, em parte, à sua composição em aminoácidos, pois quanto maior o número de resíduos polares (hidrofílicos) maior será a sua capacidade de adsorção. Outros fatores também podem estar relacionados como a força iônica, conformação proteica e temperatura (Offer & Knight, 1988). Por esta razão, estes parâmetros são um dos principais fatores na caracterização das propriedades funcionais das proteínas, principalmente quando destinadas a serem utilizadas em formulações de alimentos, como produtos cárneos.

A capacidade de reter água (CRA) dos isolados não diferiu ($P > 0,05$), exceto nos HIPsal tratados com nitrito, onde foi verificado menores ($P < 0,05$) valores. A adição de nitrito pode ter alterado o equilíbrio hidrofílico/hidrofóbico da superfície da proteína, afetando conseqüentemente a capacidade da proteína de interagir com a água (Moure, Domínguez, Zúñiga, Soto, & Chamy, 2002; Were, Hettiarachchy, & Kalapathy, 1997). Além disso, era esperado que a maior presença de proteínas sal-solúveis (proteínas miofibrilares) nos extratos obtidos por solução salina (Tabela 1) contribuísse com uma maior CRA, uma vez que estas são as principais responsáveis por esta propriedade na carne (Chen et al., 2017; Devine & Dikeman, 2014). No entanto, a ausência deste efeito, pode ser correlacionado a densidade de cargas elétricas presentes na molécula de proteína em solução (Fennema et al., 2017).

Tabela 3. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) e dos tratamentos (com e sem adição de nitrito) nas propriedades funcionais (média \pm desvio padrão) de isolados de coração suíno (PHI) obtidos por precipitação isoeletrica.

Características	Extração aquosa		Extração salina		Protéínas de Referência	
	HIPaq	HIPaq-N	HIPsal	HIPsal-N	IPS	CPS
Capacidade de retenção de água (g/g proteína)	5,91 \pm 1,43 ^a	4,97 \pm 0,16 ^{ab}	5,39 \pm 1,53 ^{ab}	3,74 \pm 0,56 ^b	5,07 \pm 0,92 ^{ab}	9,62 \pm 0,40 ^c
Capacidade de retenção de óleo (g/g proteína)	2,92 \pm 1,13 ^a	2,39 \pm 0,38 ^{ab}	3,13 \pm 0,42 ^a	3,28 \pm 1,06 ^a	2,14 \pm 0,26 ^b	1,54 \pm 0,28 ^b
Capacidade de emulsão, CE (mL óleo/g)	2,33 \pm 0,22 ^a	1,82 \pm 0,57 ^b	2,21 \pm 0,26 ^a	1,62 \pm 0,15 ^b	2,77 \pm 0,59 ^c	3,11 \pm 0,71 ^d
Estabilidade de emulsão, ES (%)	9,47 \pm 0,69 ^a	7,91 \pm 1,34 ^{bc}	7,74 \pm 1,03 ^{bc}	5,88 \pm 1,67 ^b	8,59 \pm 0,44 ^{ac}	13,6 \pm 1,67 ^d
Índice de atividade emulsificante, IAE (m ² /g)	38,42 \pm 1,71 ^a	38,48 \pm 3,29 ^a	62,53 \pm 3,68 ^b	55,76 \pm 3,94 ^b	43,82 \pm 7,25 ^a	54,52 \pm 4,08 ^b
Índice de estabilidade da emulsão, IEE (min)	14,22 \pm 0,68 ^a	14,27 \pm 0,42 ^a	13,45 \pm 0,05 ^a	13,63 \pm 0,12 ^a	13,51 \pm 1,14 ^a	16,54 \pm 1,25 ^b

HIPaq-N e HIPsal-N = solução de extração com adição de nitrito de sódio; IPS =isolado proteico de soja; CPS =concentrado proteico de soro; e *nd* =não detectado.

^{a-d} Médias, na linha, seguidas de letras diferentes diferem (P < 0,05) pelo teste de Duncan.

Ademais, todos os HIP apresentaram CRA semelhante ($P > 0,05$) a encontrada para o IPS, mas sendo observado maiores valores no CPS, apesar do menor teor de proteína deste. Estes resultados corroboram com outros trabalhos, mesmo observando efeitos isolados. Costa et al. (2019), ao avaliarem a CRA em concentrados proteicos de coração, fígado e rim de suínos, sugerem que amostras com maiores teores proteicos não garantem uma boa CRA, o que corrobora com os resultados encontrados para o concentrado (CPS). Ainda Costa et al. (2019), embora tenham avaliado apenas um tipo de solução de extração, encontraram uma maior CRA para o concentrado proteico de coração suíno em frações solúveis, com valores médios de 3,30 g/g de amostra, em relação aos concentrados de fígado e rim. Já Toldrá et al. (2019), avaliaram a CRA na fração insolúvel de extratos proteicos de baço bovino adicionadas de sal, e relataram que melhores propriedades (maior CRA) foram alcançadas usando tampões de extração em $\text{pH} \geq 6,5$ e concentrações intermediárias de NaCl na faixa de 1,5 a 3,5%, sendo maiores teores de sal indesejáveis. Tal fato pode explicar a menor CRA obtida para o isolado extraído em solução salina e tratado com nitrito em relação ao controle de água, pois o nitrito também é fonte de sódio, aumentando, assim, a concentração, o que pode ter provocado efeito negativo para a CRA.

A capacidade de retenção de óleo (CRO) dos HIP não diferiu ($P > 0,05$), independentemente do tipo de solução de extração e da adição ou não de nitrito, mas foi maior do que aquela observada para as referências comerciais IPS e CPS. Pérez-Andrés, Álvarez, Cullen, and Tiwari (2019) também encontraram em sua pesquisa uma boa CRO para pulmões bovinos comparado às referências utilizadas, inclusive quando aplicada outra tecnologia de extração.

Cabe destacar que os isolados de coração suínos são compostos por diferentes tipos de proteínas quando comparado às referências comerciais utilizadas, conseqüentemente, cada uma pode ter sido afetada de uma forma. Para alguns grupos proteicos, a extração pode ter aumentado a exposição de seus grupos hidrofílicos, enquanto outros podem ter sido expostos a mais grupos hidrofóbicos, ou vice-versa (ARAÚJO, 2011).

Quanto à capacidade de emulsão (CE), medida pelo volume de óleo que pode ser solubilizado por uma quantidade específica de proteína, os HIPaq e HIPsal apresentaram maior ($P < 0,05$) CE do que quando tratados com nitrito. Por outro lado, maiores valores foram observados para o CPS, seguido do IPS. A maior CE obtida para o CPS pode estar associada à sua maior CRA. A capacidade de emulsão está relacionada ao equilíbrio hidrofóbico-hidrofílico das proteínas. Neste estudo, os HIP apresentaram menor afinidade por água quando comparados

ao CPS, por exemplo. Este aumento significativo na hidrofobicidade provavelmente causou perdas no equilíbrio entre os grupos hidrofóbicos-hidrofílicos, levando à redução da capacidade de emulsificação (Aoki, Taneyama, Orimo, & Kitagawa, 1981).

A estabilidade de emulsão (ES), outra propriedade funcional emulsificante e que representa a capacidade das emulsões de resistirem a mudanças físico-químicas ao longo do tempo, foi afetada pelos tratamentos ($P < 0,05$) com o HIPaq apresentando maiores valores do que os demais HIP. Quando comparado às referências proteicas, a ES da IPS foi similar aos HIPaq e HIPsal (não tratados com nitrito), mas os maiores valores foram observados para a CPS. A maior CE e ES do CPS pode ser devido a um maior teor de gordura observada neste concentrado (Tabela 1), uma vez que Bos and Van Vliet (2001) relataram que amostras com maior percentual de lipídios provavelmente associados a lipoproteínas hidrofóbicas favorecem simultaneamente a formação e estabilização da emulsão.

O índice de atividade emulsificante (IAE) e índice de estabilidade da emulsão (IEE) também foram avaliados. De modo geral, o IAE indica a capacidade da proteína de adsorver na interface durante a formação da emulsão, evitando a floculação e coalescência das pequenas gotículas de gordura, enquanto o IEE estima em minutos a taxa de “quebra” da emulsão, devido à coalescência e formação de creme das gotículas de gordura. Portanto, valores de IAE e IEE aumentam quando as proteínas favorecem a formação e estabilização da emulsão (Darine et al., 2010; Selmane et al., 2008). Todas as amostras de HIPsal apresentaram uma maior ($P < 0,05$) atividade emulsificante (IAE) em relação às HIPaq, não sendo afetadas pelos tratamentos de nitrito. Além disso, as amostras HIPsal foram iguais ($P > 0,05$) à referência de CPS, apresentando os maiores índices para a atividade emulsificante, enquanto as HIPaq foram semelhantes ($P > 0,05$) ao ISP. Em relação ao índice de estabilidade de emulsão (IEE), os HIP não diferiram ($P > 0,05$), independentemente do tipo de solução de extração e do tratamento ou não com nitrito, com valores iguais ($P > 0,05$) aos da referência comercial IPS e menores ($P < 0,05$) que os do CPS.

Embora não tenham observado nenhum efeito da força iônica para a IAE, como neste estudo, Toldrá et al. (2019) observaram melhores IEE para extratos proteicos de baço suíno, quando utilizada a concentração de 3-4% de NaCl. Ainda, os autores sugerem que em teores mais baixos de NaCl, a estabilidade da emulsão seria reduzida pela metade. Zouari, Fakhfakh, Amara-Dali, Sellami, Msaddak, and Ayadi (2011) confirmaram o mesmo efeito em proteínas de fígado de peru, obtendo emulsões com índices mais pronunciados para altas concentrações de NaCl (até 10 g/L). No entanto, sabe-se que, o impacto do sal nas propriedades emulsificantes

das proteínas, tanto de origem animal quanto vegetal, encontrados na literatura ainda são bastante contraditórios. Além disso, segundo Liu, Peng, Zhong, Liu, Zhong, and Wang (2018), o IAE e IEE podem ser influenciados por muitos fatores, incluindo pH.

Os HIP apresentaram características tecnológicas gerais bem próximas às encontradas para o ISP, comumente utilizado, gerando um grande potencial de utilização com função tecnológica. E, embora a proteína referência de soro (CPS) tenha se destacado para algumas características tecno-funcionais, sendo este, um dos principais objetivos de seu uso, os HIP também exibiram excelente CRO frente à este concentrado, e um IAE igual para os HIPsal.

3.3. Composição nutricional

Alguns minerais são elementos essenciais capazes de coordenar funções fisiológicas importantes do nosso corpo. Cálcio, potássio, sódio e fósforo são macroelementos, enquanto o ferro é um oligoelemento vital, necessário para a manutenção da saúde humana, de modo que uma ingestão insuficiente desse mineral pode causar sintomas de deficiência nutricional (Seong et al., 2014; Tapiero & Tew, 2003). Diante disto, conhecer a composição mineral dos isolados foi de grande interesse neste estudo.

Na Figura 3, é descrito a composição mineral dos isolados de coração suíno extraídos por diferentes soluções (aquosa e salina). Os minerais dominantes na composição dos HIPaq foi o ferro seguido do cálcio, o que era esperado uma vez que são os principais minerais presentes no músculo cardíaco (Devine & Dikeman, 2014; Honikel, 2011). No entanto, a extração por solução salina aumentou o teor de sódio nos isolados, que se tornou o segundo maior mineral presente nos HIPsal, oriundo do NaCl utilizado para aumentar a força iônica da solução de extração. Ainda, embora não analisados, provavelmente magnésio (Mg) e cloro (Cl) também estariam presentes e são descritos como minerais presentes na composição.

As amostras de HIPaq apresentaram uma maior concentração de ferro total, embora, de modo contrário, o ferro heme exibiu maior proporção no extrato HIPsal. Segundo Shahidi, Samaranayaka, and Pegg (2014), sais de NaCl aceleram a reação de cura, devido à formação de cloreto de nitrosila (NOCl), que é uma espécie nitrosante (conversão de compostos orgânicos em derivados de NO) mais poderosa do que o anidrido nitroso formado em solução aquosa. Tal fato pode justificar os extratos HIPsal terem apresentado maiores concentrações de ferro heme, pois o sal atuou como um coadjuvante, se ligando aos pigmentos e prevenindo a solubilização

de ferro heme, como discutido para PHT, pois, estando ligado, o mineral ficaria mais solúvel, justificando o maior teor encontrado.

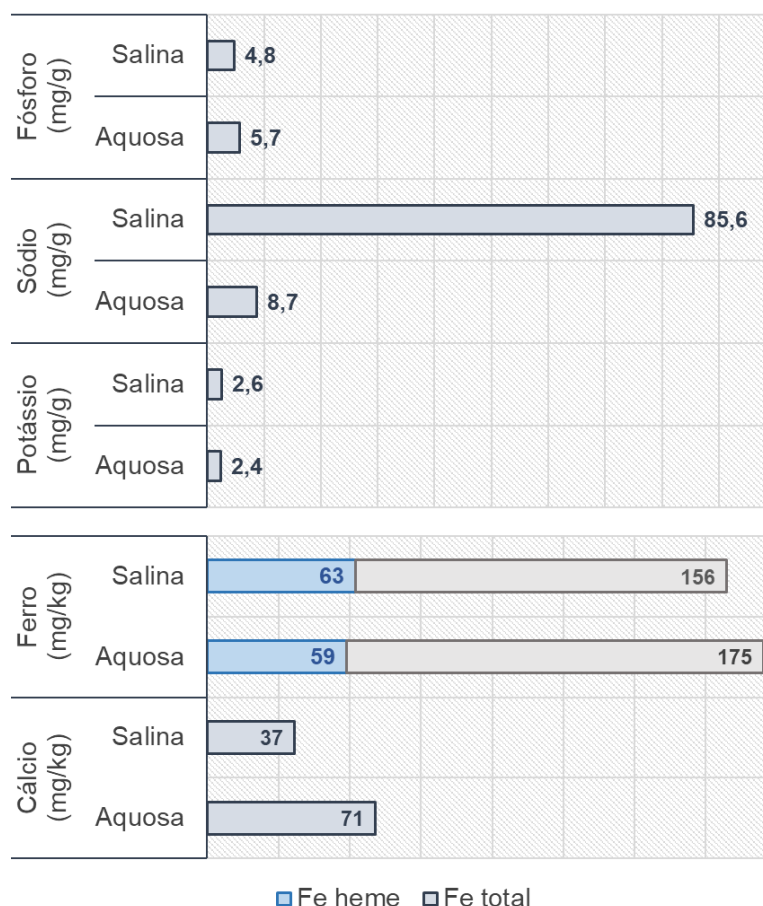


Figura 3. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) nos teores dos minerais cálcio (Ca), ferro (Fe), potássio (K), sódio (Na) e fósforo (P) em isolados de coração suíno (HIP) obtidos por precipitação isoeletrica.

Os minerais dominantes na composição dos HIPaq foi o ferro seguido do cálcio, o que era esperado uma vez que são os principais minerais presentes no músculo cardíaco (Devine & Dikeman, 2014; Honikel, 2011). No entanto, a extração por solução salina aumentou o teor de sódio nos isolados, que se tornou o segundo maior mineral presente nos HIPsal, oriundo do NaCl utilizado para aumentar a força iônica da solução de extração. Ainda, embora não analisados, provavelmente magnésio (Mg) e cloro (Cl), também estariam presentes e são descritos como minerais presentes na composição.

As amostras de HIPaq apresentaram uma maior concentração de ferro total, embora, de modo contrário, o ferro heme exibiu maior proporção para os HIPsal. Segundo Shahidi, Samaranayaka, and Pegg (2014), sais de NaCl aceleram a reação de cura, devido à formação de cloreto de nitrosila (NOCl), que é uma espécie nitrosante (conversão de compostos orgânicos em derivados de NO) mais poderosa do que o anido nitroso formado em solução aquosa. Tal fato pode justificar o fato dos HIPsal terem apresentado maiores concentrações de ferro heme, pois o sal atuou como um coadjuvante, se ligando aos pigmentos, prevenindo a solubilização de ferro heme, como discutido para PHT, estando ligado, o mineral ficaria mais solúvel, justificando o maior teor encontrado.

A deficiência de ferro é a principal deficiência mineral em todo o mundo e foi identificada como uma das seis prioridades da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Reshan Jayawardena et al., 2022). O ferro heme é um mineral proveniente da hemoglobina e mioglobina, altamente biodisponível, sendo mais eficiente do que o ferro não heme encontrado em vegetais. A absorção de ferro heme é da ordem de 15 a 35%, enquanto o ferro não heme apresenta uma taxa de absorção de apenas 1 a 10% (Gomide et al., 2013; Pereira & Vicente, 2013; Ramos & Gomide, 2017a). Desta forma, pelo seu melhor aproveitamento, o ferro heme é fundamental para combater e prevenir a anemia ferropriva, comum em crianças, gestantes sem acompanhamento adequado de pré-natal e mulheres em idade fértil. A ingestão diária recomendada para o teor de ferro é de 10 mg por dia para um adulto (Honikel, 2011) saudável; portanto, o consumo de aproximadamente 7% do HPI já seria suficiente para garantir mais de 100% das necessidades de ferro. Além disso, estes HIP podem ser utilizados em outras matrizes alimentícias como fonte de ferro heme

Maiores concentrações de cálcio foram observadas nos HIPaq do que nos HIPsal, e podem ser atribuídas a um processo de lixiviação (Reshan Jayawardena et al., 2022) do cálcio junto ao sódio na etapa de extração proteica com sal. Valores próximos (64,13 mg/kg) aos encontrados para os HIPaq foram reportados por Seong et al. (2014), ao analisarem a concentração de cálcio em coração suíno *in natura*.

De maneira similar ao ferro, existe uma preocupação com o baixo teor de cálcio na dieta, comum em muitas populações. A ausência de cálcio contribui para o raquitismo nutricional/osteomalácia, osteoporose, osteopenia e hipocalcemia em crianças/adultos, além de aumentar o risco de vários problemas de saúde, como em gestantes (Heaney, 2000; Palacios, Hofmeyr, Cormick, Garcia-Casal, Peña-Rosas, & Betrán, 2021). O cálcio é um nutriente preocupante, pois as necessidades nutricionais recomendadas, nem sempre são fáceis de serem

atendidas na ausência de produtos lácteos (Palacios et al., 2021). Segundo a WHO e FAO (2004), as recomendações variam muito de acordo com a idade, sexo e fases da vida (gravidez e lactação). Para lactente, a recomendação varia de 300 a 400 mg/dia de cálcio, 1.300 mg/dia em crianças de 9 a 18 anos e idosos e 1.000 mg/dia de cálcio adultos até 65 anos. No entanto, a WHO e FAO (2004) também reconhece situações especiais em que a suplementação de cálcio ou níveis mais elevados podem ser necessários. Desta forma, o emprego dos HIP, principalmente os HIPaq, também é sugestivo como fonte de ingestão de cálcio na dieta.

Para o sódio, conforme esperado, os HIPsal demonstraram uma maior concentração de sódio em relação aos HIPaq. Tal efeito observado, referente ao aumento da concentração de sódio das amostras, está justamente associado e pode ser justificado ao fato de que, foram adicionadas duas fontes deste mineral aos isolados, o NaCl e também o nitrito de sódio. No entanto, todos os valores encontrados para os tratamentos estão bem abaixo da meta estipulada pela Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA), juntamente com o Ministério da Saúde (MS) para o Brasil, que foi de 314 mg/g para produtos prontos, concentrados, elaborados à base de carnes e derivados (ABIA, 2017). Além disso, cabe também ressaltar que o coração *in natura* pode conter cerca de 1300 mg/kg de sódio (Seong et al. (2014).

Concentrações ligeiramente maiores de potássio foram observadas nos HIPsal, enquanto o teor de fósforo foi maior nos HIPaq. Assim como o cálcio, o fósforo, está presente nas membranas celulares, integrando a estrutura para a formação dos ossos e dentes, participando também ativamente do metabolismo e contração muscular (Tomović et al., 2019). Segundo Seong et al. (2014), em subprodutos cárneos com estruturas musculares como coração, macronutrientes (Ca, P, Na, K, Mg) estariam mais disponíveis em relação à outros.

A composição de aminoácidos para os HIP obtidos é descrita na Tabela 4 e os escores de aminoácidos essenciais (EAA) são representados na Figura 4. Foram encontrados os aminoácidos essenciais (EAA) em ambos os isolados, apresentando o isolado em solução aquosa um maior somatório.

Tabela 4. Composição (média \pm desvio padrão) de aminoácidos de isolados de corações suíno, obtidos por precipitação isoelétrica, utilizando solução de extração aquosa (HIPaq) e salina (HIPsal), ingestão diária recomendada (IDR)¹ para adultos, índice de aminoácidos essenciais (IAAE) e eficiência proteica (PER).

Aminoácidos	HIPaq	HIPsal	IDR/FAO
Essenciais, EAA (mg/g proteína)			
Histidina, His	26,30 \pm 0,34	21,72 \pm 0,57	15
Isoleucina, Ile	44,29 \pm 0,83	34,13 \pm 1,05	30
Leucina, Leu	84,65 \pm 1,45	68,58 \pm 1,68	59
Lisina, Lys	79,25 \pm 1,72	64,26 \pm 1,55	45
Metionina, Met	30,91 \pm 0,58	24,26 \pm 0,69	16 (22 [†])
Fenilalanina, Phe	41,03 \pm 0,97	33,35 \pm 0,78	30 [‡]
Treonina, Thr	45,19 \pm 1,11	35,12 \pm 1,01	23
Triptofano, Trp	9,78 \pm 0,13	7,87 \pm 0,24	6
Valina, Val	48,79 \pm 0,98	38,11 \pm 1,09	39
Σ EAA	410,19	327,41	
Não essenciais, NEAA (mg/g proteína)			
Alanina, Ala	55,87 \pm 1,12	44,87 \pm 1,12	
Arginina, Arg	63,29 \pm 1,22	49,19 \pm 1,44	
Asparagina, Asp	95,55 \pm 1,94	76,56 \pm 1,90	
Cisteína, Cis	11,58 \pm 0,24	10,97 \pm 0,31	
Glutamina, Glu	142,42 \pm 2,93	114,12 \pm 2,83	
Glicina, Gli	39,57 \pm 1,16	30,03 \pm 0,97	
Hidroxiprolina, Hip*	1,57 \pm 0,1	0,44 \pm 0,12	
Prolina, Pro	37,66 \pm 1,16	29,14 \pm 0,91	
Serina, Ser	40,13 \pm 0,63	32,02 \pm 0,85	
Taurina, Tau*	1,12 \pm 0,01	0,89 \pm 0,02	
Tirosina, Tyr	34,62 \pm 0,64	27,37 \pm 0,75	
Σ NEAA	523,38	415,60	
Total AA	933,57	743,01	
Índice de aminoácidos essenciais, IAAE			
(%)	160,13	127,68	
Razão de eficiência proteica, PER			
	50,52	40,98	

¹ Padrão de referência da FAO/WHO (2007) calculado a partir das necessidades diárias médias de aminoácidos e proteínas (0,66 g/kg por dia).

[†]Requerido para Metionina + Cisteína.

[‡]Requerido para Fenilalanina + Tirosina.

*Aminoácidos não-padrão.

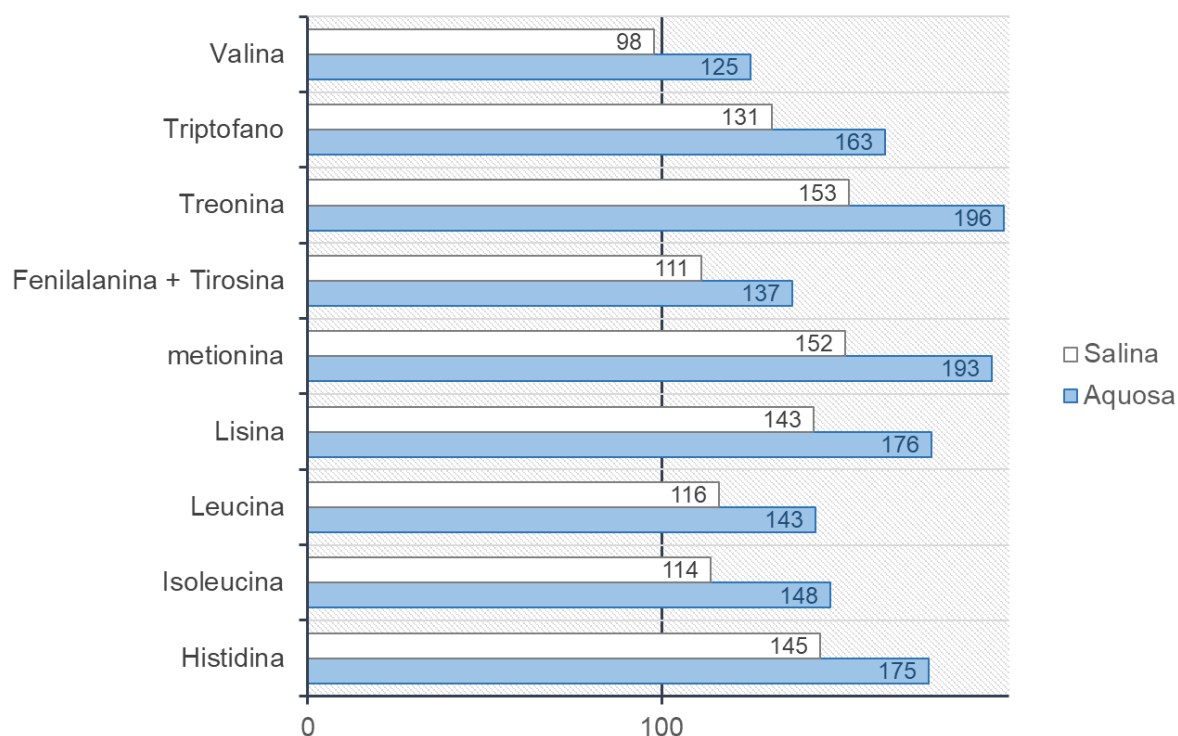


Figura 4. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) nos escores (AAES) de aminoácidos essenciais em isolados de coração suíno (HIP) obtidos por precipitação isoeletrica.

Os EAA são componentes indispensáveis quando nos referimos a qualidade proteica, pois são aqueles que não podem ser sintetizados no corpo humano, sendo necessário o consumo para um bom funcionamento (Jayawardena et al., 2019). Os HIP, independente da solução de extração utilizada, apresentaram valores de EAA superiores (Tabela 4) aos recomendados pela FAO (2007) de ingestão diária (IDR), exceto para valina. No entanto, através dos escores de aminoácidos (AAES) (Figura 4), todas as amostras de HIP apresentaram valores bem próximos ou superiores a 100 para EAA, especialmente as HIPaq. Segundo Bártoová, Bárta, Brabcová, Zdráhal, and Horáčková (2015), quanto maior os AAES, mais equilibrada é a composição aminoacídica e maior será a qualidade e eficiência da proteína.

Desta maneira, em relação a eficiência proteica (PER), os HIPaq também demonstraram maiores valores em relação aos HIPsal através dos escores observados na figura 4, especialmente para o aminoácido metionina, sugerindo, assim, uma estimativa para alta digestibilidade destes isolados (Yang, Huang, Zhang, Zhang, Huang, & Yang, 2018). Ainda, de acordo com a FAO (2007), Metionina (Met), Lisina (Lys) e Triptofano (Trp) são os aminoácidos mais limitantes possíveis de se encontrar em proteínas. No entanto, Mullen, Álvarez, Zeugolis, Henschion, O'Neill, and Drummond (2017), em seu estudo, demonstraram

que havia uma quantidade desses três aminoácidos para uma variedade de subprodutos, dentre eles, coração suíno. Segundo os autores, a quantidade de Lys, Met e Trp foi de 8,3% 2,6% e 1,2%, respectivamente. Logo, como representado na Tabela e Figura 4, os HIP forneceram quantidades satisfatórias e balanceadas destes EAA.

Além disto, deve-se ressaltar também que é importante que a proteína apresente uma composição de aminoácidos bem distribuída, pois quando somente um é predominante, alterações individuais podem ocorrer, promovendo mudanças no sabor final do alimento (Hidalgo & Zamora, 2004; Jurado, García, Timón, & Carrapiso, 2007). Um maior teor de um aminoácido específico pode influenciar em uma percepção de doce (calculado como soma dos teores de alanina, serina, prolina, treonina e glicina), amargo (calculado como soma de leucina, valina, isoleucina, metionina e fenilalanina), ácido (fenilalanina, histidina, glutâmico e teor de ácido aspártico) e atributos envelhecidos (calculado como soma dos teores de lisina, tirosina e ácido aspártico) (Pérez-Santaescolástica et al., 2019). Isto reforça ainda mais a importância de se conhecer a composição aminoacídica de um novo produto alimentício, pois além de sua grande importância nutricional, os aminoácidos podem estar diretamente relacionados com aspectos sensoriais.

Segundo Mullen and Álvarez (2016), os subprodutos cárneos, dentre eles os de suínos, fornecem EAA e não essenciais variando de 38% a 49% e estão muito próximos do nível de EAA encontrados na carne magra, que é de aproximadamente 50%, com concentração de lisina (LYS) e histidina (HYS) entre 7-8 e 2-3 g/100 g, respectivamente. Todos os HIP continham cerca de 44% de EAA, mas as maiores quantidades, tanto de EAA quanto de AA totais foram encontradas nos HIPaq. Jayawardena et al. (2019) também encontraram valores satisfatórios de EAA (31- 45%) ao obterem pós de pulmão bovino, sendo a Leu (88.72) e a Lys (81.06) os principais EAA encontrados no seu perfil de aminoácidos.

Em relação aos aminoácidos não essenciais, o ácido aspártico e glutâmico foram os mais abundantes na composição, especialmente para os HIPaq. Além desses, a arginina também pode ser encontrada, sendo muito requerida para crianças e considerada como um aminoácido condicionalmente essencial (PEREIRA e VICENTE, 2013). Portanto, os HIP, principalmente os HIPaq, podem ser considerados fontes de EAA.

4. Conclusões

O presente estudo demonstrou grande viabilidade para a produção de isolados proteicos a partir de coração de suínos. Todos os isolados avaliados apresentaram um alto teor de proteína, semelhante à referência comercial do isolado proteico de soja. Do ponto de vista nutricional, os isolados proteicos, em especial os HIPaq, demonstraram-se como uma excelente fonte de aminoácidos essenciais. Ainda, estas amostras apresentaram em sua composição mineral, ferro total e cálcio como majoritários, além da presença de ferro heme, sendo estes micronutrientes altamente associados para o combate à desnutrição e outras doenças.

Ademais, a utilização de diferentes soluções na etapa de extração proteica, modificou o perfil das proteínas obtidas. Maiores frações sal-solúveis foram encontradas para os HIPsal, o que também pode ser comprovado por meio das bandas de proteínas miofibrilares, observadas na eletroforese. Além disso, os HIPsal apresentaram uma cor mais clara e menos intensa do que os HIPaq, e a utilização de nitrito auxiliou na tonalidade avermelhada dos isolados, tornando-a mais atrativa.

Quanto aos parâmetros tecno-funcionais, os HIP demonstraram-se características tecnológicas gerais bem próximas às encontradas para o ISP, comumente utilizado industrialmente. E, embora a proteína referência de soro (CPS) tenha se destacado para algumas características tecno-funcionais, os HIP também exibiram excelente CRO frente à este concentrado, e um IAE igual para os HIPsal.

Desta forma, os resultados do estudo indicam que todos os HIP demonstraram potencial para a utilização como ingrediente alimentar, não havendo empecilho de nenhum tratamento. No entanto, é importante que a finalidade do uso seja definida, de modo que para adição em dietas e suplementação alimentar, os melhores a serem adicionados são os HIPaq, enquanto para a obtenção de funções tecnológicas o HIPsal com nitrito é o mais indicado e, para estabilização da cor, o HIPsal com nitrito deve ser preferido.

Referências

- ABCS. (2021). Dados de Mercado de Suínos- 2021. *Associação Brasileira dos Criadores de Suínos*.
- ABIA. (2017). *Indústrias retiram mais de 17 mil toneladas de sódio dos alimentos*. São Paulo.

- Alsmeyer, R. H., RH, A., AE, C., & ML, H. (1974). Equations predict PER from amino acid analysis.
- Aluko, R. E., & McIntosh, T. (2001). Polypeptide profile and functional properties of defatted meals and protein isolates of canola seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(4), 391-396.
- Anzani, C., Boukid, F., Drummond, L., Mullen, A. M., & Álvarez, C. (2020). Optimising the use of proteins from rich meat co-products and non-meat alternatives: Nutritional, technological and allergenicity challenges. *Food Research International*, 137, 109575.
- AOAC. (2012). Official Methods of Analysis. In A. o. O. A. Chemists (Ed.), Gaithersburg, MD: 19th ed., p. 1298.
- Aoki, H., Taneyama, O., Orimo, N., & Kitagawa, I. (1981). Effect of lipophilization of soy protein on its emulsion stabilizing properties. *Journal of food science*, 46(4), 1192-1195.
- ARAÚJO, J. M. A. (2011). Química de Alimentos: teoria e prática. atual. ampl. Viçosa, MG. UFV.
- Bártová, V., Bárta, J., Brabcová, A., Zdráhal, Z., & Horáčková, V. (2015). Amino acid composition and nutritional value of four cultivated South American potato species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 78-85.
- Bergman, I., & Loxley, R. (1963). Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Analytical chemistry*, 35(12), 1961-1965.
- Bishnoi, S., Khanna, N., Bishnoi, N., Tewari, A., Ghadwal, S., & Ahlawat, S. S. (2015). Development of chicken meat powder incorporated instant Idli mixes. *Journal of Animal Research*, 5(3), 527.
- Bos, M. A., & Van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in colloid and interface science*, 91(3), 437-471.
- Brasil. (2017). Regulamenta a lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, ea lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, 3.

- Chatterjee, R., Dey, T. K., Ghosh, M., & Dhar, P. (2015). Enzymatic modification of sesame seed protein, sourced from waste resource for nutraceutical application. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 70-81.
- Chen, X., Tume, R. K., Xu, X., & Zhou, G. (2017). Solubilization of myofibrillar proteins in water or low ionic strength media: Classical techniques, basic principles, and novel functionalities. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(15), 3260-3280.
- Chevalier, R. C., Pizato, S., de Lara, J. A. F., & Cortez-Vega, W. R. (2018). Obtaining protein isolate of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its application as coating in fresh-cut melons. *Journal of food safety*, 38(5), e12496.
- da Costa, C. G. C., Paula, M. M. O., Massingue, A. A., Torres Filho, R. A., Ramos, E. M., & Carneiro, J. D. S. (2019). Protein concentrates obtained from pig by-products using pH-shifting technique: a preliminary study. *Ciência Rural*, 49.
- Darine, S., Christophe, V., & Gholamreza, D. (2010). Production and functional properties of beef lung protein concentrates. *Meat science*, 84(3), 315-322.
- Devine, C., & Dikeman, M. (2014). *Encyclopedia of meat sciences*: Elsevier.
- Dutra, M. P., Cardoso, G. P., Fontes, P. R., Silva, D. R. G., Pereira, M. T., Ramos, A. d. L. S., & Ramos, E. M. (2017). Combined effects of gamma radiation doses and sodium nitrite content on the lipid oxidation and color of mortadella. *Food chemistry*, 237, 232-239.
- FAO. (2007). Dietary protein quality evaluation in human nutrition. *Food and Agriculture Organization of the United Nations.*, 92, 1-66.
- FAO. (2018). The future of food and agriculture: alternative pathways to 2050. . *Food and Agriculture Organization of the United Nations.*, Rome,.
- Fennema, O. R., Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2017). *Fennema's food chemistry*: CRC press.
- Fonkwe, L., & Singh, R. (1996). Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. *Process biochemistry*, 31(6), 605-616.
- Gomide, L. d. M., Ramos, E., & Fontes, P. (2013). Ciência e qualidade da carne: fundamentos. *Viçosa: Editora UFV*, 155-185.
- Guimarães, A. S., Guimarães, J. S., Araújo, A. B. S., Rodrigues, L. M., Carvalho, E. E. N., Ramos, A. d. L. S., & Ramos, E. M. (2021). Characterization of natural curing agents

- from Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) for their use in clean label restructured cooked meat products. *LWT*, 150, 111970.
- Hagen, S. R., Frost, B., & Augustin, J. (1989). Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. *Journal of the association of Official analytical Chemists*, 72(6), 912-916.
- Havea, P., Singh, H., Creamer, L. K., & Campanella, O. H. (1998). Electrophoretic characterization of the protein products formed during heat treatment of whey protein concentrate solutions. *Journal of Dairy Research*, 65(1), 79-91.
- Heaney, R. P. (2000). Calcium, dairy products and osteoporosis. *Journal of the American college of nutrition*, 19(sup2), 83S-99S.
- Hidalgo, F. J., & Zamora, R. (2004). Strecker-type degradation produced by the lipid oxidation products 4, 5-epoxy-2-alkenals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 7126-7131.
- Honikel, K.-O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat science*, 78(1-2), 68-76.
- Honikel, K. (2011). Composition and Calories In: Nollet LML, Toldrá F, editors. Handbook of Analysis of Edible Animal By-Products. In: CRC Press.
- Hornsey, H. (1956). The colour of cooked cured pork. I.—Estimation of the Nitric oxide-Haem Pigments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 7(8), 534-540.
- Hrynets, Y., Omana, D. A., Xu, Y., & Betti, M. (2011). Comparative study on the effect of acid-and alkaline-aided extractions on mechanically separated turkey meat (MSTM): Chemical characteristics of recovered proteins. *Process biochemistry*, 46(1), 335-343.
- Jayawardena, S. R., Morton, J. D., Brennan, C. S., & Bekhit, A. E. D. A. (2019). Utilisation of beef lung protein powder as a functional ingredient to enhance protein and iron content of fresh pasta. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(3), 610-618.
- Jurado, Á., García, C., Timón, M. L., & Carrapiso, A. I. (2007). Effect of ripening time and rearing system on amino acid-related flavour compounds of Iberian ham. *Meat science*, 75(4), 585-594.
- Kim, H. K., Ha, S. J., Kim, Y. H., Hong, S. p., Kim, Y. U., Song, K. M., Lee, N. H., & Jung, S. K. (2017). Protein extraction from porcine myocardium using ultrasonication. *Journal of food science*, 82(5), 1059-1065.

- Kim, H. K., Kim, Y. H., Kim, Y. E., Jung, S. K., Lee, N. H., & Song, K.-M. (2018). Effects of salts on ultrasonic extraction of protein from porcine myocardium. *Food and Bioproducts Processing*, 108, 12-17.
- Kim, Y., Cheong, J., Yang, S., & Lee, M. (1991). Functional properties of the porcine variety meats. *Korean Journal of Animal Sciences (Korea Republic)*.
- Liu, C.-m., Peng, Q., Zhong, J.-z., Liu, W., Zhong, Y.-j., & Wang, F. (2018). Molecular and functional properties of protein fractions and isolate from cashew nut (*Anacardium occidentale* L.). *Molecules*, 23(2), 393.
- Livingston, D., & Brown, W. (1981). The chemistry of myoglobin and its reactions. *Food Technology(RESEARCH)*.
- Long, J. M., & Mohan, A. (2021). Development of meat powder from beef byproduct as value-added food ingredient. *LWT*, 146, 111460.
- Lucas, B., & Sotelo, A. (1980). Effect of different alkalies, temperature, and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. *Analytical Biochemistry*, 109(1), 192-197.
- Lynch, S. A., Álvarez, C., O'Neill, E. E., Keenan, D. F., & Mullen, A. M. (2018). Optimization of protein recovery from bovine lung by pH shift process using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 1951-1960.
- Massingue, A. A., Torres Filho, R. d. A., Fontes, P. R., Asaam, S., Gomes, M. E. d. S., Ramos, A. d. L. S., & Ramos, E. M. (2019). Effect of washing cycles and solutions on chemical composition and physicochemical properties of the surimi-like material from mechanically deboned turkey meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(5), e13929.
- Matak, K. E., Tahergorabi, R., & Jaczynski, J. (2015). A review: Protein isolates recovered by isoelectric solubilization/precipitation processing from muscle food by-products as a component of nutraceutical foods. *Food Research International*, 77, 697-703.
- Mora, L., Toldrá-Reig, F., Reig, M., & Toldrá, F. (2019). Possible uses of processed slaughter byproducts. In *Sustainable meat production and processing*: Elsevier, p. 145-160.
- Moure, A., Domínguez, H., Zúñiga, M. a. E., Soto, C., & Chamy, R. (2002). Characterisation of protein concentrates from pressed cakes of Guevina avellana (Chilean hazelnut). *Food chemistry*, 78(2), 179-186.
- Mullen, A., & Álvarez, C. (2016). Offal: types and composition.

- Mullen, A. M., Álvarez, C., Zeugolis, D. I., Henchion, M., O'Neill, E., & Drummond, L. (2017). Alternative uses for co-products: Harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. *Meat science*, *132*, 90-98.
- Nuckles, R., Smith, D., & Merkel, R. (1990). Meat by-product protein composition and functional properties in model systems. *Journal of food science*, *55*(3), 640-643.
- Offer, G., & Knight, P. (1988). The structural basis of water-holding capacity in meat. *Developments in meat science*, *4*, 173-243.
- Ohkuma, C., Kawai, K., Viriyarattanasak, C., Mahawanich, T., Tantratian, S., Takai, R., & Suzuki, T. (2008). Glass transition properties of frozen and freeze-dried surimi products: Effects of sugar and moisture on the glass transition temperature. *Food Hydrocolloids*, *22*(2), 255-262.
- Okezie, B. O., & Bello, A. (1988). Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate. *Journal of Food Science*, *53*(2), 450-454.
- Palacios, C., Hofmeyr, G. J., Cormick, G., Garcia-Casal, M. N., Peña-Rosas, J. P., & Betrán, A. P. (2021). Current calcium fortification experiences: A review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1484*(1), 55-73.
- Parés, D., Toldrà, M., Camps, E., Geli, J., Saguer, E., & Carretero, C. (2020). RSM Optimization for the Recovery of Technofunctional Protein Extracts from Porcine Hearts. *Foods*, *9*(12), 1733.
- Park, S., Brewer, M., Novakofski, J., Bechtel, P., & McKeith, F. (1996). Process and characteristics for a surimi-like material made from beef or pork. *Journal of food science*, *61*(2), 422-427.
- Paula, M. M. d. O., Buchili, A. F. M., Fontes, P. R., Ramos, A. d. L. S., & Ramos, E. M. (2022). Extraction of proteins from aqueous and salt solutions of porcine edible by-products using the pH-shifting technique. *Food and Bioproducts Processing* . (Manuscript 01).
- Paula, M. M. d. O., Haddad, G. d. B. S., Rodrigues, L. M., Júnior, A. A. B., Ramos, A. d. L. S., & Ramos, E. M. (2019). Effects of PSE meat and salt concentration on the technological and sensory characteristics of restructured cooked hams. *Meat science*, *152*, 96-103.
- Pegg, R. B., & Shahidi, F. (2008). *Nitrite curing of meat: The N-nitrosamine problem and nitrite alternatives*: John Wiley & Sons.

- Pereira, P. M. d. C. C., & Vicente, A. F. d. R. B. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, *93*(3), 586-592.
- Pérez-Andrés, J. M., Álvarez, C., Cullen, P. J., & Tiwari, B. K. (2019). Effect of cold plasma on the techno-functional properties of animal protein food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *58*, 102205.
- Pérez-Santaescolástica, C., Carballo, J., Fulladosa, E., Munekata, P. E. S., Bastianello Campagnol, P. C., Gómez, B., & Lorenzo, J. M. (2019). Influence of high-pressure processing at different temperatures on free amino acid and volatile compound profiles of dry-cured ham. *Food Research International*, *116*, 49-56.
- Petrucelli, S., & Anon, M. C. (1995). Soy protein isolate components and their interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*(7), 1762-1767.
- Ramos, E. M., & Gomide, L. A. M. (2017). *Avaliação da qualidade de carnes: Fundamentos e metodologias* (2a ed.). Viçosa: Editora UFV.
- Reshan Jayawardena, S., Morton, J. D., Bekhit, A. E.-D. A., Bhat, Z. F., & Brennan, C. S. (2022). Effect of drying temperature on nutritional, functional and pasting properties and storage stability of beef lung powder, a prospective protein ingredient for food supplements. *LWT*, *161*, 113315.
- Rodrigues, L. M., Guimarães, A. S., Ramos, J. L., Fontes, P. R., Ramos, A. L. S., & Ramos, E. M. R. (2022). Application of gamma radiation in the beef texture development during accelerated aging. *Journal of Texture Studies*.
- Roufik, S., Paquin, P., & Britten, M. (2005). Use of high-performance size exclusion chromatography to characterize protein aggregation in commercial whey protein concentrates. *International Dairy Journal*, *15*(3), 231-241.
- Selmane, D., Christophe, V., & Gholamreza, D. (2008). Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties. *Meat Science*, *79*(4), 640-647.
- Seong, P. N., Park, K. M., Cho, S. H., Kang, S. M., Kang, G. H., Park, B. Y., Moon, S. S., & Van Ba, H. (2014). Characterization of edible pork by-products by means of yield and nutritional composition. *Korean journal for food science of animal resources*, *34*(3), 297.
- Shahidi, F., Samaranyaka, A., & Pegg, R. (2014). Curing| Brine Curing of Meat, p. 19-30.
- Shen, Q. W., Swartz, D. R., Wang, Z., Liu, Y., Gao, Y., & Zhang, D. (2016). Different actions of salt and pyrophosphate on protein extraction from myofibrils reveal the

- mechanism controlling myosin dissociation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(6), 2033-2039.
- Steen, L., Glorieux, S., Goemaere, O., Brijs, K., Paelinck, H., Foubert, I., & Fraeye, I. (2016). Functional properties of pork liver protein fractions. *Food and Bioprocess Technology*, 9(6), 970-980.
- STEPHAN, M. (2008). Utilização de eletroforese (SDS-PAGE) para detecção de proteína isolada de soja e de concentrado proteico de soro de leite em lombo suíno.
- Tapiero, H., & Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(9), 399-411.
- Toldrà, M., Parés, D., Saguer, E., & Carretero, C. (2019). Recovery and Extraction of Technofunctional Proteins from Porcine Spleen Using Response Surface Methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 12(2), 298-312.
- Toldrà, M., Parés, D., Saguer, E., & Carretero, C. (2020). Utilisation of protein fractions from porcine spleen as technofunctional ingredients in emulsified cooked meat sausages. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(2), 871-877.
- Tomović, V., Šojić, B., Jokanović, M., Škaljac, S., Ivić, M., Tomović, M., Tomašević, I., Stajić, S., & Martinović, A. (2019). Mineral contents in pork and edible offal from indigenous pigs. *Journal of engineering & processing management*, 11(1), 66-72.
- Tsermoula, P., Virgili, C., Ortega, R. G., Mullen, A. M., Álvarez, C., O'Brien, N. M., O'Flaherty, E. A., & O'Neill, E. E. (2019). Functional protein rich extracts from bovine and porcine hearts using acid or alkali solubilisation and isoelectric precipitation. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 1292-1298.
- USDA. (2021). United States Department of Agriculture. *Production, Supply and Distribution*.
- Were, L., Hettiarachchy, N., & Kalapathy, U. (1997). Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties. *Journal of food science*, 62(4), 821-824.
- WHO, W. H. O., & FAO, F. A. O. (2004). *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*. (2nd ed. ed.): Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Yang, F., Huang, X., Zhang, C., Zhang, M., Huang, C., & Yang, H. (2018). Amino acid composition and nutritional value evaluation of Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) and its protein subunit. *RSC advances*, 8(5), 2653-2659.

- Zhu, Y., Bao, M., Chen, C., Yang, X., Yan, W., Ren, F., Wang, P., & Wen, P. (2021). Comparison of the Nutritional Composition of Bullfrog Meat from Different Parts of the Animal. *Food Science of Animal Resources*, 41(6), 1049.
- Zouari, N., Fakhfakh, N., Amara-Dali, W. B., Sellami, M., Msaddak, L., & Ayadi, M. (2011). Turkey liver: Physicochemical characteristics and functional properties of protein fractions. *Food and Bioproducts Processing*, 89(2), 142-148.

ARTIGO III

Artigo redigido conforme a norma do periódico *Journal of Cleaner Production*
“Versão Preliminar”

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS PROTEICOS OBTIDOS DE FÍGADO SUÍNO
COMO INGREDIENTE TECNO-FUNCIONAL OU DE BIOFORTIFICAÇÃO EM
ALIMENTOS**

*Characterization of protein isolates obtained from porcine liver as technofunctional or
biofortification ingredient in foods*

Resumo

Este estudo teve como objetivo obter e caracterizar isolados proteicos de fígado suíno (LIP), extraídos em solução aquosa (LIPaq) ou salina (LIPsal), adicionados ou não de nitrito de sódio, quanto as propriedades tecnológicas, funcionais e nutricionais. Os LIPsal apresentaram maior teor de proteína (90,83 vs 87,99 %), além de maior proporção de proteínas sal-solúveis (50,22 vs 43,12%) do que os LIPaq. A tonalidade ($h = 61,0^\circ$) da cor foi igual para todos os isolados, no entanto, a amostra LIPsal com nitrito apresentou uma cor menos intensa ($C^* = 26,25$ vs $34,1$) do que as demais amostras, sendo constatada diferença ainda maior através do ΔE^* ($9,71$ vs $5,09$). Quanto às propriedades tecno-funcionais, os isolados de forma geral apresentaram boa capacidade emulsificante (CE) e de estabilidade de emulsão (ES), semelhantes as referências comerciais; ainda, o LIPsal adicionado de nitrito exibiu a melhor capacidade de retenção de óleo (CRO) (3,86 vs 2,67%). Do ponto de vista nutricional, os isolados continham alto teor de ferro (740,5 mg/kg), com os LIPsal tendo maior teor de sódio e ferro-heme do que os LIPaq. Os LIP continham todos os aminoácidos essenciais (AAE) e com escores acima do requerido. Foi observado um maior índice de AAE (40,55 vs 55,30) e eficiência proteica estimada (136,49 vs 119,88) nos LIPaq do que nos LIPsal. Os resultados indicam um alto potencial de uso dos LIP como ingredientes proteicos em produtos cárneos ou para a dieta, devido as suas propriedades tecno-funcionais semelhantes a referências já utilizadas e, ainda, especialmente à presença de grande quantidade de ferro de todos AAE.

Palavras-chave: Extração proteica; ferro heme; novo produto; subproduto cárneo

1. Introdução

O fígado, incluindo o de suínos, é um subproduto comestível gerado no abate, rico em proteína de alta qualidade nutricional além de consistir em fonte de vitaminas e minerais, como o ferro heme (Honikel, 2011; Mullen et al., 2017; Steen et al., 2016). No Brasil, o fígado suíno pode ser comercializado cru; porém, ainda existe um pequeno mercado consumidor para este produto, sendo destinados à fabricação de alimentos para animais de estimação, produtos farmacêuticos e cosméticos, fertilizantes, produtos cárneos processados ou à exportação (Costa et al., 2019; Maluf et al., 2020).

No entanto, diante da atual preocupação com a demanda projetada por proteína no mundo, uma vez que, a população global deve chegar a 10 bilhões em 2050; as projeções da FAO (2018) sugerem a necessidade de um aumento em quase 70% na produção/fornecimento de proteína para alimentação humana. Conseqüentemente, isto torna necessário o aproveitamento de fontes proteicas como os subprodutos cárneos, além de também reduzir o impacto ambiental e melhorar a rentabilidade da indústria, uma vez que, em um animal vivo, apenas cerca de 45-60% de seu peso é constituído por carne, sendo o restante subprodutos (Abril et al., 2022; Muir et al., 2008; Reshan Jayawardena et al., 2022).

Dentre as alternativas mais promissoras para o aproveitamento de subprodutos, está a sua utilização como biofortificante ou ingrediente tecno-funcional em alimentos. Os alimentos fortificados são utilizados para auxiliar na prevenção da carência de micronutrientes, especialmente a anemia carencial ferropriva, considerada o distúrbio nutricional de maior prevalência mundial (Jayawardena et al., 2019; Reshan Jayawardena et al., 2022). Segundo SREBERNICH et al. (2018), o fígado suíno em pó demonstrou-se um excelente fortificante, recomendando assim a sua inclusão, por exemplo, em cardápios de merenda escolar, sopas, cremes, carnes cozidas, e especialmente feijão.

Como ingrediente tecno-funcional, as proteínas dos órgãos quando extraídas, podem apresentar excelentes funções tecnológicas, com propriedade emulsificante e gelificante conferidas por quantidades satisfatórias presentes, auxiliando na capacidade de retenção de água e textura. Comumente vários ingredientes, muitos derivados de fontes não cárneas, são utilizados em produtos processados cárneos, como as proteínas vegetais (soja, em especial) do leite (soro, caseína, etc.) ou de ovos (Kim et al., 1991; Toldrà et al., 2020). Estas são usadas para atender requisitos tecnológicos como agentes extensores, ligantes, dentre outras funções tecno-funcionais. Desta forma, o desenvolvimento de novos ingredientes alimentícios, como

concentrados e isolados proteicos de fígado, para fins como biofortificante, agentes extensores ou análogos de carne possuem um grande potencial (Anzani et al., 2020; Jayawardena et al., 2019), e para isto a utilização de técnicas eficientes de recuperação e concentração proteica devem ser utilizadas.

Dentre as alternativas tecnológicas para a extração proteica em subprodutos, cárneos, estão as técnicas de mudança de pH, processo também conhecido como solubilização e precipitação isoeletrica (ISP). Paula et al. (2022a) juntamente a este método, extraíram proteínas em fígado e coração de suínos utilizando diferentes sais (monovalente e divalentes). Ademais, tratamentos auxiliares para a estabilização na cor, também podem ser aplicados simultaneamente à etapa, como a adição de nitrito de sódio (NaNO_2), de maneira que, uma cor mais atrativa e estável seja alcançada, e permaneça após etapas de secagem, obtendo um ingrediente com uma maior aceitação visual. No entanto, até o momento de nosso conhecimento nenhum estudo avaliou esta possibilidade em fígados suínos.

Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar isolados proteicos obtidos de fígado suíno extraídos por diferentes soluções de extração, adicionados ou não de nitrito, quanto a composição centesimal, nutricional e funcional, para um potencial uso como biofortificante ou ingrediente tecno-funcional.

2. Material e métodos

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Ciência e Tecnologia de Carnes e Derivados (LabCarnes) do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), da Escola de Ciências Agrárias de Lavras (ESAL), e no laboratório de Caracterização Físico-Química de Alimentos do Departamento de Nutrição (DNU), da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1. Obtenção dos isolados proteicos

As amostras de fígado suíno ($\text{pH} = 6,17$; Proteína = $23,06 \pm 0,40\%$; gordura = $1,85 \pm 0,41\%$; Umidade = $73,92 \pm 2,23\%$; e cinzas = $0,99 \pm 1,50\%$) congeladas e embaladas a vácuo foram fornecidas, em três lotes distintos, por um frigorífico local (Nutrili, Lavras, Minas Gerais, Brasil) e transportadas para o Laboratório de Ciência e Tecnologia de Carnes (LabCarnes) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Os isolados proteicos de fígado (LIP) foram obtidos pela técnica da precipitação isoeletrica avaliando a solução de extração, aquosa ou salina (4% de NaCl e 0,05% de MgCl₂), com ou sem adição de 0,2 mg/mL de nitrito de sódio (NaNO₂) na etapa de precipitação, conforme proposto por Paula et al. (2022a). Assim, quatro tratamentos foram avaliados: 1) LIPaq, extração aquosa; 2) LIPaq-N, extração aquosa + adição de nitrito; 3) LIPsal, extração em solução salina; e 4) LIPsal-N, extração em solução salina + adição de nitrito. Os valores de pH para as etapas de extração (solubilização) e de precipitação proteica também foram definidas em estudo anterior (Paula et al. (2022a).

Os fígados foram cortados em pedaços, pesados e homogeneizados nas soluções de extração (a 4 °C), na proporção de 1:5 (m/v), durante 10 min, utilizando um liquidificador industrial (marca, modelo, cidade, país). O pH dos extratos foi primeiramente ajustado (DM 20; Digimed São Paulo, Brasil) para 11, utilizando soluções de NaOH (0,2 M ou 1,0 M), para solubilização das proteínas. A solução homogeneizada foi mantida em repouso por 20 min sob refrigeração (4 °C) e, finalizada a solubilização, centrifugada (Hettich EBA 21; Hettich GmbH & Co.KG, Alemanha) a 3000×g por 15 min. A gordura em suspensão foi removida manualmente, com o auxílio de espátula e o sobrenadante filtrado em tecido de organza comercial. O pH do filtrado foi ajustado utilizando HCl (0,2 M ou 1,0 M) para valores próximos de 6,0, quando foi adicionado o nitrito de sódio nos tratamentos, e finalmente para 2,0 para a precipitação das proteínas em solução salina e para 5,0, em solução aquosa (ponto isoeletrico; PI), conforme descrito em (Paula et al. (2022). Uma vez ajustado o pH dos extratos no valor do PI, estes foram novamente centrifugados a 3000×g por 15 min para separação da fração proteica. O novo sobrenadante foi descartado e o precipitado proteico congelado em ultracongelador com sistema de ar estático (Coldlab, modelo CL120-86V, Piracicaba, SP, Brasil) a -75 °C até posterior secagem.

As amostras congeladas foram liofilizadas (Edwards, modelo L4KR, São Paulo, Brasil; -40 °C, pressão de vácuo de 0,998 mbar) por 48h, refinadas em moedor de grãos (Hamilton Beach, EUA.), embaladas a vácuo (BD420; R.Baião, MG, Brasil), e armazenadas a temperatura ambiente até o momento das análises de caracterização.

Os LIP obtidos foram caracterizados quanto à composição e suas propriedades tecnológicas, funcionais e nutricionais. As propriedades tecno-funcionais de um concentrado proteico de soro (CPS) e um isolado proteico de soja (IPS) da marca comercial (New Max Industrial Ltda) também foram avaliados como referência, por estes serem extensores comumente utilizados na formulação de produtos cárneos no Brasil.

2.2. Caracterização tecnológica

2.2.1 Composição centesimal

A determinação da composição centesimal dos isolados obtidos e das proteínas de referência (CPS e IPS) foi realizada, segundo a metodologia oficial da AOAC (AOAC, 2012), sendo: umidade por secagem em estufa a 105 °C (método 925.45b); resíduo mineral fixo por incineração em mufla a 550 °C (método 923.03); proteínas, pelo método de microKjeldahl (método 960.52), utilizando o fator de 6,25; e extrato etéreo, pelo método de Soxhlet (método 920.39).

2.2.2 Fracionamento quanto a solubilidade proteica

As proteínas da carne são geralmente agrupadas em três categorias com base em sua solubilidade: 1) proteínas sarcoplasmáticas, que são solúveis em água ou em soluções de força iônica muito baixa; 2) proteínas miofibrilares, que são solúveis em soluções salinas com força iônica tão alta quanto 0,6 M; e 3) proteínas do estroma (ou do tecido conjuntivo) que permanecem insolúveis independentemente da força iônica da solução (Matak et al., 2015; Ramos, E. and Gomide, L., 2017). As proteínas dos LIP foram fracionadas quanto a sua solubilidade (1 - solúvel em água; 2 - solúvel em solução salina; e 3 - fração insolúvel), a partir de adaptações do procedimento descritos por Zhu et al. (2021). Cerca de 0,2 g do LIP foi pesado e adicionado de 10 mL de tampão com força iônica muito baixa (0,05 M KCl, 20 mM Tris-HCl; pH 7,5). A mistura foi homogeneizada (Ultra-Turrax TE-102; Tecnal Equipamentos Científicos, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por 2 min, mantida em repouso (a 4°C) por 60 min, e, então, centrifugada (Sigma 3K30; Laborzentrifugen, Alemanha) a 11.000×g por 20 min (a 4 °C). O precipitado foi lavado mais duas vezes com 10 mL de solução tampão. Os resíduos foram separados e o teor de proteínas (solúveis em água) no sobrenadante quantificado pelo método de Biureto. Os resíduos desta primeira extração foram, então, suspensos com 10 mL de tampão de média força iônica (0,6 M KCl, 20 mM Tris-HCl; pH 7,5), mantido em repouso (a 4°C) por 18 h e centrifugado a 11.000×g por 20 min (a 4 °C). O sobrenadante também foi separado e as proteínas (solúveis em solução salina) quantificadas pelo método de Biureto. O teor de proteínas insolúveis foi determinado por diferença, considerando o teor de proteína no LIP.

A quantificação das proteínas nas frações pelo teste de Biureto foi conduzida segundo descrito por Ramos, E.M. and Gomide, L.A.M. (2017). Brevemente, alíquotas de 1 mL das

amostras foram misturadas com 4 mL de reagente Biureto, homogeneizados, mantidos em repouso por 20 min em quarto escuro e a absorvância lida (Genesys 10 UV; Thermo Scientific Varian, São Paulo, Brasil) a 540 nm. O teor de proteína em solução foi determinado a partir de curva analítica obtida com albumina de soro bovino (BSA) e os valores expressos em g/100 g proteína.

2.2.3 Pigmentos heme totais

O teor de pigmentos heme totais (PHT) foi determinado por adaptação do método espectrofotométrico de hematina ácida proposto por Hornsey (1956) e descrito por Ramos, E. and Gomide, L. (2017). Cerca de 1,0 g de isolado foram dissolvidos em 20 mL de solução de extração (acetona 78% e ácido clorídrico 3,15%), sendo os tubos tampados, agitados (vórtex) por 15 s e armazenados (no escuro e à temperatura ambiente) por 60 min. Os extratos obtidos foram centrifugados a $3000\times g$ por 10 min e os sobrenadantes foram filtrados, sendo a absorvância medida a 640 nm contra um branco de reagente. A concentração de PHT nos isolados foi expresso em μg de hematina/g de amostra, considerando 652 como a massa molecular e $4,80 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ como coeficiente de extinção da hematina ácida.

2.2.4 Teor de colágeno total

O teor de colágeno total foi determinado após digestão úmida de 1 g do isolado em 10 mL de ácido sulfúrico 7M a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ por 16h. Logo após, o hidrolisado foi filtrado com carvão ativo e o volume completado para 100 mL. Uma alíquota de 2 mL foi adicionada para 1 mL de solução oxidante, permanecendo na ausência de luz por 20 min. Posteriormente, 1 mL de solução Ehrlich foi adicionada as soluções, misturadas, e mantidas em banho-maria por 15 min à $65 \text{ }^\circ\text{C}$, no escuro, para a leitura em espectrofotômetro a 558 nm (Ramos, E. and Gomide, L., 2017). O teor de colágeno total foi quantificado pela determinação do aminoácido hidroxiprolina (Bergman and Loxley, 1963).

2.2.5 Teor de nitrito residual

O teor de nitrito residual (NO_2R) foi determinado segundo adaptações do protocolo AOAC nº 973.31 (AOAC, 2012) descritos por Guimarães et al. (2021). Cerca de 5 g do isolado foram adicionados de 40 mL de água destilada quente ($80 \text{ }^\circ\text{C}$), e a mistura mantida em banho-maria por duas horas à $80 \text{ }^\circ\text{C}$ para extração. Posteriormente, a mistura ainda quente foi filtrada para um balão de 250 mL e o volume completado com água destilada. Em um tubo de ensaio

envolto em papel alumínio, uma alíquota de 2 mL do filtrado foi misturada a 1 mL de água destilada e 0,2 mL de solução sulfanilamida 1% (em ácido clorídrico 0,5 M), sendo agitado e o tubo mantido em repouso, no escuro e à temperatura ambiente, por 5 min. A mistura foi, então, transferida para um balão volumétrico de 10 mL, sendo adicionado 0,2 mL de solução N-(1-naftil) etilenodiamina hidrocloreto (NED) 0,1% e o volume completado. A nova mistura foi novamente mantida por 15 min, no escuro e à temperatura ambiente, antes da leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Os teores de NO₂R foram determinados por curva analítica de nitrito de sódio (NaNO₂), e os valores expressos em mg NO₂/kg.

2.2.6 Cor instrumental

A avaliação da cor foi conduzida utilizando-se um espectrofotômetro portátil CM-700 (Kônica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japão), padronizado para leitura em porta de 8 mm, com o iluminante D65 e ângulo de 10° para o observador e luz especular incluída *excluída (SCE). Os isolados foram dispostos em placas de Petri (obtendo uma altura padronizada de 1 cm), e a leitura realizada em três partes distintas da superfície, com o conjunto disposto sob uma superfície branca, sendo os índices CIELAB (L^* = luminosidade; a^* = índice de vermelho; e b^* = índice de amarelo) e as coordenadas angulares de saturação (C^*) e ângulo de tonalidade (h , graus) registradas. A diferença global de cor da CIE (ΔE^*) entre os isolados LIP foi calculado pela Equação 1, enquanto o índice de “brancura” (whiteness; W^*), de todos isolados (incluindo as referências), calculada pela Equação 2 (Park et al., 1996).

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (\text{Eq.1})$$

$$W^* = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{Eq.2})$$

Em que L^* , a^* e b^* são as coordenadas de cor da CIE para a amostra a ser avaliada e L_0^* , a_0^* e b_0^* as coordenadas da amostra de referência (LIPaq ou LIPsal).

2.3 Propriedades tecno-funcionais

2.3.1 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água (CRA) foi avaliada segundo metodologia descrita por da Costa et al. (2019). Um grama do isolado proteico foi adicionado de 25 mL de tampão fosfato

(0,1 M; pH 6,5) em tubo de centrífuga previamente tarado. O tubo foi agitado (Agitador modelo 109, Nova Ética, SP) por 5 min e posteriormente centrifugado a 3000×g por 20 min. A água foi removida cuidadosamente do tubo, o precipitado pesado e o resultado expresso como a massa de água retida pela massa de proteína total presente na amostra (g/g proteína).

2.3.2 Capacidade de retenção de óleo

A capacidade de retenção de óleo (CRO) foi avaliada, segundo metodologia descrita por Fonkwe and Singh (1996), citada por Chevalier et al. (2018). Um grama do isolado foi adicionado de 20 mL de óleo vegetal de canola em tubo de centrífuga previamente tarado. O tubo foi agitado por 10 min e centrifugado a 3000×g por 20 min. O óleo foi removido cuidadosamente do tubo, o precipitado pesado e o resultado expresso em massa de óleo retido pela massa de proteína total presente na amostra (g/g proteína).

2.3.3 Capacidade emulsificante

A capacidade emulsificante (CE) foi determinada, segundo o método descrito por Okezie and Bello (1988). Um grama de proteína foi homogeneizado com 34 mL de solução de cloreto de sódio 3% e a mistura mantida sob agitação (em agitador mecânico), adicionando-se óleo de canola através de uma bureta até a formação de emulsão, determinada pela dispersão do óleo sobre a proteína diluída, não havendo mistura. A capacidade emulsificante foi determinada como o volume de óleo gasto para formar a emulsão pela quantidade total de proteína (mL óleo/g).

2.3.4 Índices de atividade emulsificante e de estabilidade da emulsão

Os índices de atividade emulsificante (IAE) e de estabilidade da emulsão (IEE) dos isolados foram determinados pela técnica da turbidez, descrita por Chatterjee et al. (2015), com pequenas modificações. Aproximadamente 60 mg do isolado foram dispersos em 6 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 7,0) e, após agitação por 30 min à temperatura ambiente, 2 mL de óleo de soja foi adicionado e a mistura homogeneizada a 14.000 rpm até formar uma emulsão homogênea (~ 60s). Uma alíquota de 50 µL da emulsão (do fundo do tubo) foi retirada, diluída em 5 mL de solução SDS 0,1%, misturado (vórtex) e a absorvância imediatamente medida a 500 nm. Após 10 min de repouso, outros 50 µL de emulsão foram misturados com 5 mL de solução SDS 0,1%, e a absorvância a 500 nm novamente medida. Os índices IAE e IEE foram determinados pelas Equações 3 e 4, respectivamente.

$$\text{IAE (m}^2\text{/g)} = \frac{2 \times 2,303 \times A_0}{\theta \times P_a} \quad (\text{Eq.3})$$

$$\text{IEE (min)} = A_0 \times \frac{10}{A_0 - A_{10}} \quad (\text{Eq.4})$$

Em que A_0 e A_{10} são as absorvâncias imediatamente após a formação de emulsão e depois de 10 min, respectivamente, θ é a fração volumétrica de óleo na emulsão e P_a é o peso (g) da proteína na emulsão.

2.4 Caracterização nutricional

A caracterização nutricional foi feita apenas nos isolados proteicos de fígado obtidos por solução aquosa (LIPaq) e por solução salina (LIPsal), sem adição de nitrito.

2.4.1 Teor de minerais

Os minerais cálcio (Ca), ferro (Fe), potássio (K), sódio (Na) e fósforo (P) foram quantificados por fotometria de chama após digestão úmida, conforme descrito por Paula et al. (2019). Brevemente, 2 g de amostra foram pesados em tubos digestores, adicionados de 8 mL de ácido nítrico concentrado e 2 mL de ácido perclórico 70% e digeridos a 90 °C, até a obtenção de uma solução límpida. As amostras digeridas foram diluídas para 50 mL com água deionizada em um balão volumétrico, e a leitura realizada em um fotômetro de chama B262 (Micronal, São Paulo, São Paulo, Brasil).

O teor de ferro-heme (mg/kg), ferro orgânico altamente biodisponível, também foi avaliado a partir dos resultados da determinação de hematina ácida (PHT; item 2.2.3), considerando como massa molecular 55,85 para o ferro e 652 para a hematina ácida.

2.4.2 Perfil de aminoácidos

A análise de aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando um cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão). As amostras foram hidrolisadas (fenol 3% em HCl 6 M) por 24 h a 110 °C, seguida de derivatização em pré-coluna com isotiocianato de fenila. Os aminoácidos foram separados em fase reversa usando uma coluna Luna C-18 (100 Å, 5 µm, 250 × 4,6 mm; Phenomenex, Torrance, CA) a 50°C e quantificados usando um detector de UV a 254 nm (Hagen et al., 1989). Os resíduos de triptofano foram determinados após hidrólise alcalina (hidróxido de bário 4 M) de acordo com

a metodologia proposta por Lucas and Sotelo (1980).

Com base no perfil de aminoácidos, o escore químico de cada aminoácido essencial (AAES), expresso como uma porcentagem dos valores de aminoácido padrão requeridos, e o índice de aminoácidos essenciais (IAAE) foram calculados pelas Equações 5 e 6 (FAO/WHO, 2007; Alsmeyer et al. (1974).

$$AAES (\%) = 100 \times \frac{AAE_A}{AAE_R} \quad (\text{Eq.5})$$

$$IAAE (\%) = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n AAES_i} \quad (\text{Eq.6})$$

Em que AAE_A e AAE_R são o teor (mg/g de proteína) do aminoácido essencial encontrado no isolado e no padrão de referência (aminoácidos requeridos) da FAO/WHO (2007), respectivamente, e n é o número de aminoácidos considerados para o cálculo (9 AAE; o par fenilamina + tirosina foi contando como 1).

Os valores da razão de eficiência proteica (PER) dos isolados também foram estimados pela Equação 7 (Alsmeyer et al., 1974), considerando os aminoácidos metionina (Met), leucina (Leu), histidina (Hys) e tirosina (Tyr).

$$PER = - 1,816 + 0,435 \times \text{Met} + 0,780 \times \text{Leu} + 0,211 \times \text{His} - 0,944 \times \text{Tyr} \quad (\text{Eq.7})$$

2.5 Análise estatística

Os dados foram avaliados por delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo os efeitos dos isolados testados pela análise de variância (ANOVA), considerando um nível de significância de 5%. O teste de múltiplas faixas de Duncan foi usado para determinar as diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias. Todas as análises experimentais foram realizadas em triplicata. Para o conteúdo de minerais e perfil de aminoácidos totais, os dados foram avaliados por análise descritiva. As análises estatísticas foram realizadas no software Statistica® 8.0 (StatSoft, Polônia).

3. Resultados e discussão

3.1. Composição e características tecnológicas

A caracterização dos isolados de fígado (LIP) extraídos em soluções aquosa (LIPaq) ou salina (LIPsal), com ou sem adição de nitrito de sódio, assim como das proteínas de referência, está descrita na Tabela 1. De maneira geral, quanto à composição centesimal, a proteína foi o componente majoritário dos LIP.

Os valores de umidade dos LIP foram iguais ($P > 0,05$), independentemente se tratados ou não com nitrito. Em relação às referências, as amostras diferiram somente do concentrado proteico de soro (CPS), que apresentou valores maiores ($P < 0,05$) para a umidade do que os LIP, que tiveram teor semelhantes ($P > 0,05$) ao isolado proteico de soja (ISP). Abril et al. (2022), ao secarem fígados suínos utilizando forno de convecção, obtiveram um teor médio de umidade final de 10%. Já Costa et al. (2019), ao analisarem concentrados proteicos de fígados suínos secos por liofilização, encontraram valores médios relativamente menores para a umidade, sendo de 8,54%. O método de secagem, temperatura, concentração de proteína extraída, dentre outros fatores influenciam diretamente no teor de umidade final. Assim, como neste estudo mais proteína foi extraída, e conseqüentemente, concentrada, um menor teor de umidade em relação aos demais trabalhos foi alcançado.

O teor de gordura dos LIP foi afetado ($P < 0,05$) pela adição de nitrito. Maiores ($P < 0,05$) valores para a gordura foram observadas nos LIP adicionados de nitrito de sódio. Possivelmente, a adição de nitrito na etapa de extração, como um sólido, resultou em maiores partículas no meio, ocasionando uma diminuição do arraste da gordura para a fase líquida durante as etapas de centrifugação usada no processo de recuperação de proteína (Fennema et al., 2017; Toldrà et al., 2020), como efeito não diminuiu o teor de gordura para estas amostras. Quanto às referências proteicas, os LIP sem nitrito foram semelhantes ($P > 0,05$) ao IPS, diferindo ($P < 0,05$) do CPS, que apresentou o maior teor de gordura entre as amostras. Maiores valores para a gordura (5,51%) foram reportados por Costa et al. (2019) em concentrados proteicos de fígado suíno. No entanto, apesar dos autores utilizarem a variação de pH, houve apenas uma etapa de extração, o que, conseqüentemente, afetou a extração proteica, aumentando a proporção de gordura dos produtos. Desta maneira, o método de solubilização e precipitação isoelétrica para obtenção de isolados proteicos, inclui em suas vantagens menores teores de gordura.

Tabela 1. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) e dos tratamentos (com e sem adição de nitrito) na composição (média ± desvio padrão) de isolados de fígado suíno (LIP) obtidos por precipitação isoeletrica.

Características	Extração aquosa		Extração salina		Proteínas de referência	
	LIPaq	LIPaq-N	LIPsal	LIPsal-N	IPS	CPS
Umidade (g/100g)	6,48±0,92 ^a	6,35±1,27 ^a	4,93±0,34 ^a	5,87±0,86 ^a	5,30±0,81 ^a	10,01±0,90 ^b
Proteína (g/100g)	88,82±1,24 ^a	87,16±3,27 ^a	90,46±0,88 ^b	91,21±1,46 ^b	89,74±3,97 ^a	69,49±0,91 ^c
Fração solúvel em água (g/100g proteína)	32,34±2,28 ^{ab}	33,63±1,83 ^b	30,08±1,20 ^a	25,34±0,96 ^c	15,85±0,23 ^d	41,93±1,90 ^e
Fração solúvel em sal (g/100g proteína)	43,96±1,90 ^a	42,28±3,57 ^a	52,24±0,44 ^b	48,21±2,74 ^c	10,57±0,35 ^d	18,88±1,05 ^e
Fração insolúvel (g/100g proteína)	23,71±3,35 ^a	24,09±5,39 ^a	17,68±1,57 ^b	26,45±2,35 ^a	73,58±0,58 ^c	39,18±2,95 ^d
Gordura (g/100g)	0,26±0,05 ^a	0,59±0,11 ^b	0,30±0,130 ^a	0,44±0,11 ^b	0,32±0,06 ^a	1,07±0,40 ^c
Cinzas (g/100g)	2,78±0,34 ^a	4,08±0,62 ^b	3,91±0,62 ^b	5,45±0,81 ^c	4,09±0,29 ^b	6,01±0,88 ^c
Pigmento Heme Total, PHT (µg hematina/g)	961,38±58,55	1031,9±47,69	1031,95±30,94	1049,81±89,42	-	-
Colágeno (mg hidroxiprolina/g)	1,12±0,06	1,15±0,07	1,10±0,04	1,06±0,02	-	-
Nitrito Residual, NO ₂ R (mg/kg)	<i>nd</i>	166,53±1,5 ^a	<i>nd</i>	162,77±1.02 ^b	-	-
Índices de cor						
Luminosidade, <i>L</i> [*]	54,75±0,16 ^a	58,11±2,44 ^b	59,14±0,30 ^b	59,15±0,57 ^b	82,99±3,35 ^c	79,56±2,37 ^c
Índice de vermelho, <i>a</i> [*]	15,03±0,91 ^a	17,41±2,69 ^a	15,65±1,25 ^a	13,33±1,68 ^a	4,16±0,60 ^b	9,91±0,25 ^c
Índice de amarelo, <i>b</i> [*]	30,95±0,82 ^a	27,13±2,29 ^b	32,04±0,86 ^a	22,61±1,71 ^c	16,25±0,37 ^d	30,72±1,53 ^a
Saturação, <i>C</i> [*]	34,41±1,12 ^a	32,23±0,89 ^a	35,66±1,29 ^a	26,25±2,30 ^b	16,78±0,51 ^c	32,28±1,53 ^a
Ângulo de tonalidade, <i>h</i> (°)	64,10±0,84 ^a	57,31±5,97 ^a	63,97±1,35 ^a	59,47±1,53 ^a	75,68±1,65 ^b	72,11±0,48 ^b
Índice de “brancura”, <i>W</i> [*]	43,15±0,55 ^a	47,14±1,48 ^b	45,77±0,60 ^{ab}	51,44±0,83 ^c	76,00±1,93 ^b	61,78±2,54 ^c
Diferença global da cor, ΔE [*]	-	4,57±0,23 [†]	5,62±0,71 [†]	9,71±0,55 [‡]	-	-

LIPaq-N e LIPsal-N = solução de extração com adição de nitrito de sódio; IPS =isolado proteico de soja; CPS =concentrado proteico de soro; e *nd* =não detectado.

[†]Diferença em relação à amostra controle PLIaq.

[‡]Diferença em relação à amostra controle PLIsal.

^{a-e} Médias, na linha, seguidas de letras diferentes diferem (P < 0,05) pelo teste de Duncan.

O teor de cinzas apresentou efeito ($P < 0,05$) da adição de nitrito de sódio. O LIPaq apresentou um maior ($P < 0,05$) teor de cinzas quando adicionado de nitrito em relação ao seu controle, e ainda, o mesmo efeito pode ser observado para as amostras de PLIsal, onde os valores aumentaram ($P < 0,05$) quando tratadas com nitrito. No entanto, quando comparado às referências proteicas utilizadas, o CPS e o LIPsal com nitrito, apresentaram teores de cinza maiores ($P < 0,05$) em relação aos demais tratamentos, que se assemelharam do IPS, exceto para o PLIaq controle. O maior teor de cinzas observado para os isolados tratados com nitrito pode ser devido à adição deste sal na etapa de extração, com conseqüente acréscimo de mineral, da mesma forma que o CPS também é fonte deste composto oriundo de sua matéria-prima. Resultados semelhantes foram observados por TOLDRÁ et al. (2019), ao extraírem proteínas de baço suíno, utilizando diferentes concentrações de sal. Os autores observaram maiores teores de cinzas (4,08-4,42%) ao aumentarem a adição do mineral, em 3,42-4% de NaCl.

O teor de proteína total dos LIP foi afetado ($P < 0,05$) pelo tipo de solução de extração utilizada, apresentando os LIPsal ($P < 0,05$) maior teor proteico em relação aos LIPaq. Além disso, as amostras de isolado de fígado suíno, extraídas em solução salina, exibiram maior ($P < 0,05$) teor de proteínas do que a referência comercial de isolado utilizada (IPS), da mesma forma que todos os LIP apresentaram maior ($P < 0,05$) teor do que o concentrado (CPS). Abril et al. (2022) encontraram um teor proteico médio de 74,82% em pós de fígado suíno, enquanto Costa et al. (2019) de 73,48% em frações solúveis concentradas de fígado suíno. No entanto, no Brasil, existe uma legislação vigente que estabelece normas de nomenclatura, de acordo com o teor de proteína (BRASIL, 2005), permitindo verificar que os extratos secos de fígado suíno obtidos neste estudo se aproximaram da composição de isolados proteicos.

Além disso, as proteínas podem ser agrupadas em frações, de acordo com a sua solubilidade. Para as frações proteicas, houve efeito ($P < 0,05$) da adição de nitrito e do tipo de solução. Os LIPsal adicionados de nitrito apresentaram menor ($P < 0,05$) fração de proteínas solúveis em água em relação aos demais LIP. Como esperado, a fração de proteínas sal-solúveis foi maior ($P < 0,05$) para o LIPsal do que os tratamentos de LIPaq, no entanto, a concentração diminuiu ($P < 0,05$) quando os LIPsal foram tratados com nitrito de sódio. E, de maneira contrária ao observado para as sal-solúveis, a proporção de proteínas insolúveis foi maior ($P < 0,05$) para os PLIaq e para os tratamentos com nitrito em relação ao LIPsal controle.

STEEN et al. (2016), em seu estudo com fígado suíno, encontraram teores mais elevados de frações solúveis em água (78,6%) em relação às sal-solúveis (5,1%). De maneira similar, NUCKLES et al. (1990) também revelaram maiores proporções de proteínas com solubilidade

em água (76,1%) para fígado suíno em relação as solúveis em sal (14,8%). A maior diferença encontrada no fracionamento de proteínas dos LIP em relação à outros trabalhos, possivelmente pode ser atribuída à força iônica utilizada (4%NaCl+0,05 MgCl₂), solubilizando mais proteínas miofibrilares, que em até 4% de sal promove aumento da solubilidade, resultando claramente em maior quantidade destas frações (CHEN et al., 2017). Os resultados encontrados corroboram com os observados por Paula et al. (2022b), ao avaliarem isolados proteicos de coração suíno extraídos com solução de força iônica intermediária (4%NaCl +0,05 MgCl₂) e aquosa. Os autores encontraram concentrações para as frações sal-solúveis extraídas em sal bem maiores (53,79 g/100g proteína) do que quando a solução de extração utilizada foi água (46,99 g/100g proteína). Desta maneira, o resultado confirma que uma quantidade considerável de frações sal-solúveis da proteína de fígado suíno foi recuperada através do aumento da força iônica com a utilização de soluções salinas na etapa de extração (HRYNETS et al., 2011; MATAK et al., 2015).

Em relação às referências (CPS e IPS), todos os LIP exibiram maiores ($P < 0,05$) frações proteicas comparados ao IPS, exceto para as insolúveis, apresentando a soja uma maior ($P < 0,05$) concentração. Além disto, o CPS demonstrou sendo uma das principais frações de sua proteína, as solúveis em água, com maiores ($P < 0,05$) teores comparados à todas as amostras.

Para o teor de pigmentos heme totais (PHT), uma fração das proteínas solúveis não houve efeito ($P > 0,05$) para nenhum dos tratamentos avaliados, apresentando todos os LIP a mesma concentração deste pigmento. Assim como o PHT, o teor de colágeno total das amostras também não foi afetado ($P > 0,05$) pelas soluções de extração, com ou sem adição de nitrito. Embora os PLIaq e os tratamentos com nitrito apresentassem maiores proporções para as frações insolúveis em relação ao LIPsal, no qual se agrupa o colágeno insolúvel, quando avaliado o teor total desta proteína, os LIP apresentaram a mesma composição.

A concentração de nitrito residual (NO₂R) foi afetada ($P < 0,05$) pelas diferentes soluções de extração utilizadas nos LIP, sendo a menor ($P < 0,05$) concentração observada para os LIP extraídos em solução salina. Uma vez que o nitrito interage com outros compostos na carne além da mioglobina, o teor de nitrito residual é extremamente importante no produto para exercer suas funções. Segundo Shahidi et al. (2014), sais (cloreto de sódio ou potássio) aceleram a reação de cura devido à formação de cloreto de nitrosila (NOCl), que é uma espécie nitrosante (conversão de compostos orgânicos em derivados de NO) mais poderosa do que seu anidrido nitroso (N₂O₃). Em pH mais baixo, a formação de ambas as espécies nitrosantes (N₂O₃ e NOCl) é ainda mais acelerada. Isto condiz com o resultado deste estudo, pois para a obtenção dos

isolados, o pH de precipitação nos extratos em solução salina eram mais ácidos em relação à aquosa, permitindo a reação acontecer de forma “mais rápida” e encontra uma menor concentração.

O estabelecimento da cor é o primeiro e mais evidente efeito do nitrito quando adicionado à carne e seus subprodutos e, especificadamente neste estudo, foi aplicado com objetivo de tornar a cor dos isolados proteicos mais atrativa e estável. De forma geral, a cor dos isolados foi afetada tanto pela solução de extração quanto pela adição de nitrito (Tabela 2). Todas as amostras apresentaram uma cor mais clara (maior valor de L^*) comparadas ao controle em solução aquosa. Quando a solução salina foi utilizada juntamente com nitrito de sódio, os isolados diminuíram a intensidade (menor valor de C^*) da cor. No entanto, os LIP tinham um mesmo tom de cor (valor h) e índice de vermelho (a^*), representando amostras mais avermelhadas (Figura 1).

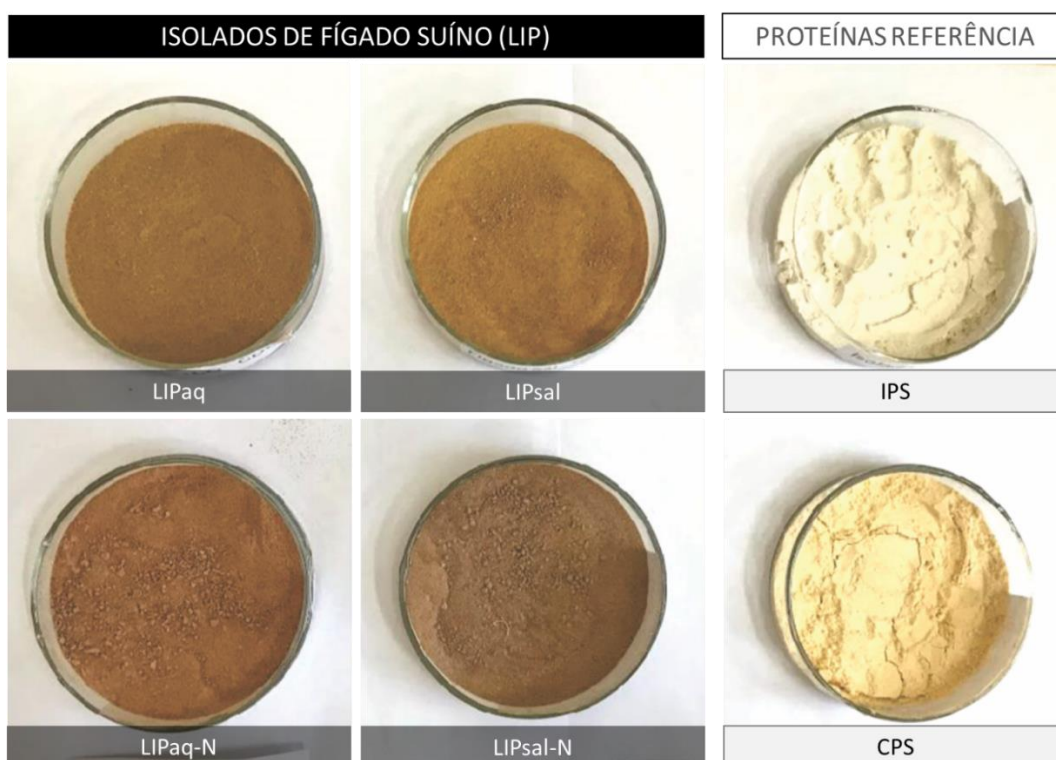


Figura 1. Fotografia dos isolados proteicos de fígado suíno e das proteínas de referência. LIPaq e LIPaq-N = extração em solução aquosa sem e com adição de NaNO_2 (0,2 mg/mL), respectivamente; LIPsal e LIPsal-N = extração em solução salina (NaCl 4%, MgCl_2 0,05%) sem e com adição de NaNO_2 (0,2 mg/mL), respectivamente; IPS = isolado proteico de soja; e CPS = concentrado proteico de soro de leite.

Para o parâmetro de luminosidade (L^*), o tratamento controle extraído em solução aquosa (LIPaq) foi mais escuro ($P < 0,05$) do que os demais extraídos em solução salina ou adicionados de nitrito. Já as referências comerciais, diferiram ($P < 0,05$) de todas as amostras de LIP, apresentando-se mais claras. Além disso, o índice de “brancura” das amostras também foi avaliado. O menor ($P < 0,05$) valor observado foi para o LIPaq, o que confirma sua cor mais escura em relação aos demais tratamentos e também quanto às referências (Figura 1).

Quanto ao índice de vermelho (a^*), os LIP não apresentaram diferença ($P > 0,05$) para as soluções de extração e adição ou não de nitrito, com média de 15,35, representativo de amostras mais avermelhadas. Já para o índice de amarelo (b^*), a adição de nitrito diminuiu ($P < 0,05$) o b^* para todos os tratamentos de LIP adicionados de nitrito, sendo ainda, um menor ($P < 0,05$) valor observado quando em solução salina. Entretanto, sabe-se que a cor é um atributo tridimensional, descrita pela luminosidade (L^*), saturação (C^*) e tonalidade (h^*), sendo que na avaliação instrumental da cor as coordenadas angulares (C e h^*) são determinadas pelos índices de cromacidade (Ramos, E. e Gomide, L., 2017; Massingue et al., 2019). Assim, a variação nos valores de a^* e b^* muitas vezes não descrevem adequadamente as diferenças na cor dos produtos. Desta forma, para a saturação (C^*), o tratamento do isolado de fígado em solução salina e adicionado de nitrito de sódio também apresentou uma cor menos intensa ($P < 0,05$) (menor valor de C^*), em relação as outras amostras, justificando o menor índice de b^* encontrado. Ainda, este isolado foi o único que diferiu ($P < 0,05$) para a referência proteica de CPS, sendo os outros LIP iguais a este concentrado quanto à intensidade.

Já para o ângulo de tonalidade (h^*), que descreve o tom da cor, pode-se observar que todas as amostras dos LIP apresentaram a mesma ($P > 0,05$) tonalidade. Este resultado pode ser corroborado pelos mesmos valores de a^* e PHT obtidos para os LIP. Desta forma, amostras de isolados de fígado suíno, independente da solução de extração ou da adição de nitrito, apresentaram um tom e cor avermelhados. Quando comparados às referências, estas como esperadas apresentaram maiores valores ($P < 0,05$) de h^* e menores para a^* , indicativo de um menor tom de vermelho em relação aos LIP, sendo associada à ausência de pigmento em sua composição.

Paula et al. (2022b) reportaram em seu estudo que o nitrito auxiliou na tonalidade avermelhada (redução do h) para isolados de coração de suíno. Embora neste trabalho o objetivo da adição de nitrito tenha sido o mesmo, a própria composição do fígado suíno pode ter contribuído para a mesma tonalidade e índice de vermelho obtido para todas as amostras. Segundo Abril et al. (2021), o fígado de suínos contém a enzima Ferroquelatase (FECH), que

catalisa e promove a formação de Zinco-protoporfirina (ZnPP) em pH alcalino e na presença de substratos de zinco e Protoporfirina IX. A formação de ZnPP ocorre pela substituição do zinco no grupo heme, a partir da hemoglobina, e a formação deste pigmento também sido relatado como sendo altamente estável e de coloração avermelhada (Abril et al., 2021; Møller et al., 2007; Wakamatsu et al., 2004), condizendo com os resultados encontrados nos isolados de fígado suíno adicionados ou não de nitrito.

No entanto, em relação à variável ΔE^* (diferença global de cor) (Tabela 1), foi também possível observar as proximidades de cor entre as amostras. Para Schubring (2009), valores ΔE^* maiores que 5 podem ser facilmente detectáveis pelo olho humano, enquanto valores acima de 12 implicam em diferença de cor absoluta, altamente perceptíveis. Os resultados encontrados para ΔE^* evidenciaram que as amostras de LIPsal adicionadas de nitrito apresentaram a maior diferença global, ou seja, dentre as amostras, a diferença de sua cor é a que mais pode ser captada pelo olho humano, fator associado à sua menor intensidade. De forma semelhante, Paula et al. (2022b) também associou uma menor intensidade (C^*) da cor aos isolados de coração tratados com nitrito.

3.2. Propriedades tecno-funcionais

As propriedades técnico-funcionais dos isolados de fígado suíno obtidos e das proteínas de referência estão descritos na Tabela 2. Estes, são uns dos principais parâmetros tecnológicos a serem caracterizados, principalmente quando destinadas a utilização em formulações de alimentos, como produtos cárneos.

A capacidade de reter água (CRA) para os isolados de fígado não diferiu ($P > 0,05$), independentemente do tipo de solução de extração e do tratamento ou não com nitrito. Em relação às referências, todos os LIP apresentaram CRA semelhante ($P > 0,05$) a encontrada para o IPS, mas sendo observado maiores valores no CPS, apesar de seu menor teor proteico (Tabela 1). Estes resultados corroboram com outros trabalhos, Paula et al. (2022b) também observaram uma maior CRA ao compararem a referência comercial de concentrado proteico de soro em relação aos isolados de coração suíno. Ainda, Costa et al. (2019) ao avaliarem a CRA em concentrados proteicos de coração, fígado e rim de suínos, sugerem que, amostras com maiores teores proteicos não garantem uma boa CRA, obtendo também maiores valores para a referência do concentrado (CPS).

Tabela 2. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) e dos tratamentos (com e sem adição de nitrito) nas propriedades funcionais (média \pm desvio padrão) de isolados de fígado suíno (LIP) obtidos por precipitação isoelétrica.

Características	Extração aquosa		Extração salina		Protéínas de Referência	
	LIPaq	LIPaq-N	LIPsal	LIPsal-N	IPS	CPS
Capacidade de retenção de água (g/g proteína)	5,35 \pm 1,06 ^a	5,42 \pm 0,75 ^a	4,68 \pm 0,13 ^a	4,70 \pm 0,55 ^a	5,13 \pm 1,29 ^a	9,44 \pm 0,37 ^b
Capacidade de retenção de óleo (g/g proteína)	2,74 \pm 0,54 ^a	2,45 \pm 0,20 ^a	2,84 \pm 0,55 ^a	3,86 \pm 0,57 ^b	2,26 \pm 0,23 ^{ac}	1,43 \pm 0,29 ^c
Capacidade de emulsão, CE (mL óleo/g)	2,36 \pm 0,26	2,33 \pm 0,28	1,88 \pm 0,59	2,03 \pm 0,79	2,55 \pm 0,64	3,42 \pm 0,66
Estabilidade de emulsão, ES (%)	7,78 \pm 0,96 ^{ab}	5,81 \pm 1,22 ^a	7,09 \pm 2,15 ^{ab}	6,99 \pm 1,33 ^{ab}	8,71 \pm 0,54 ^b	13,73 \pm 2,34 ^c
Índice de atividade emulsificante, IAE (m ² /g)	51,05 \pm 0,61 ^{ab}	53,79 \pm 2,15 ^{bc}	57,8 \pm 1,94 ^c	56,51 \pm 3,58 ^c	46,5 \pm 3,06 ^a	55,36 \pm 3,53 ^{bc}
Índice de estabilidade da emulsão, IEE (min)	13,15 \pm 0,55 ^a	13,36 \pm 0,18 ^a	13,6 \pm 0,13 ^a	13,44 \pm 0,66 ^a	12,86 \pm 0,29 ^a	17,2 \pm 0,71 ^b

LIPaq-N e LIPsal-N = solução de extração tratada com nitrito de sódio; IPS =isolado proteico de soja; CPS =concentrado proteico de soro; e *nd* =não detectado.

^{a-c} Médias, na linha, seguidas de letras diferentes diferem (P<0,05) pelo teste Duncan.

No entanto, para a capacidade de reter óleo (CRO), houve efeito ($P < 0,05$) do tipo de solução de extração e do tratamento com nitrito, sendo uma maior ($P < 0,05$) CRO obtida no LIPsal adicionado de nitrito. E, ainda esta amostra, também demonstrou uma melhor ($P < 0,05$) capacidade de retenção de óleo comparada às referências utilizadas. Possivelmente, este efeito na CRO observado para os LIPsal adicionado de nitrito, está associado ao fato de que, a capacidade de retenção aumenta quando há mais interação da proteína com grupos hidrofílicos, consequência do maior teor de gordura encontrado nesta amostra (Tabela 1).

Quanto à capacidade de emulsão (CE), medida pelo volume de óleo que pode ser solubilizado por uma quantidade específica de proteína, todas as amostras de LIP apresentaram a mesma capacidade, e ainda, iguais às das referências comerciais utilizadas. Paula et al. (2022b), encontraram em sua pesquisa uma menor CE para isolados de coração suíno quando comparado a proteínas comerciais, sendo então estes resultados mais satisfatórios para a elaboração de um isolado de subproduto cárneo à base de fígado.

A estabilidade de emulsão (ES), outra propriedade funcional emulsificante e que representa a capacidade das emulsões de resistirem a mudanças físico-químicas ao longo do tempo, não foi afetada pelos tratamentos ($P > 0,05$) utilizados para os isolados. E, quando comparado às referências proteicas, a ES da IPS foi maior ($P < 0,05$) apenas de que os LIPaq tratados com nitrito, embora os maiores resultados foram observados para a CPS.

O índice de atividade emulsificante (IAE) e índice de estabilidade da emulsão (IEE) também foram avaliados. De modo geral, os valores de IAE e IEE aumentam quando as proteínas favorecem a formação e estabilização da emulsão, respectivamente (Darine et al., 2010; Selmane et al., 2008). Todas as amostras de LIPsal e tratamentos com nitrito apresentaram uma maior ($P < 0,05$) atividade emulsificante (IAE) em relação ao LIPaq controle. E ainda, as amostras de LIP foram iguais ($P > 0,05$) a referência de CPS, enquanto a LIPaq controle semelhante ($P > 0,05$) ao ISP. Steen et al. (2016) ao analisarem o IAE de frações solúveis em água e sal-solúveis em fígado suíno adicionadas de diferentes concentrações de tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4, contendo 0, 1,8 ou 3,4% de NaCl) observaram que, a maior concentração de NaCl (3,4%) exibia as melhores propriedades emulsificantes, independente da fração proteica, e que ainda, estas eram comparáveis à referências proteicas comerciais.

Já o índice de estabilidade de emulsão (IEE), os LIP não diferiram ($P > 0,05$), independentemente do tipo de solução de extração e do tratamento ou não com nitrito, com valores iguais ($P > 0,05$) aos da referência comercial IPS e menores ($P < 0,05$) que o CPS.

Resultados próximos para o IEE foram reportados por Abril et al. (2022), encontrando um valor médio de 19 minutos para a estabilidade de emulsões formadas através de fígado suíno em pó.

De maneira geral, os LIP demonstraram características tecnológicas bem próximas às encontradas para as referências utilizadas (ISP e CPS). Em especial, quando obtidos em solução salina e adicionados de nitrito, os isolados demonstraram uma excelente capacidade de reter óleo, além da capacidade emulsionante e um bom índice de atividade emulsificante, sugerindo um alto potencial de utilização, como por exemplo, para produtos cárneos emulsionados.

3.3. Composição nutricional

Na Figura 2 é descrito a composição mineral dos isolados de fígado suíno extraídos por diferentes soluções (aquosa e salina).

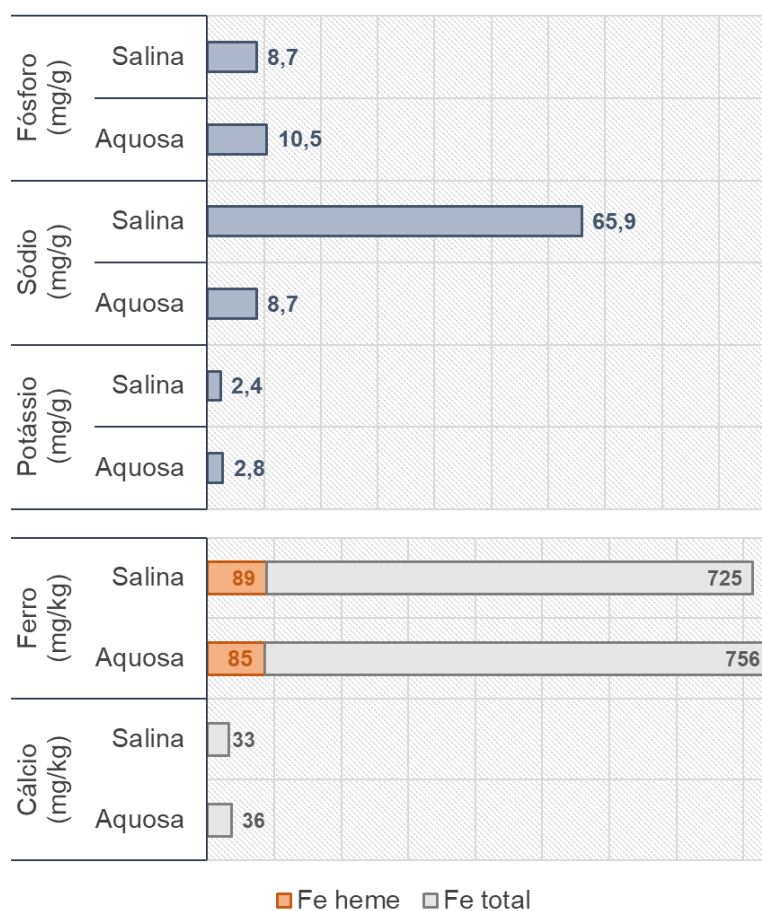


Figura 2. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) nos teores dos minerais cálcio (Ca), ferro (Fe), potássio (K), sódio (Na) e fósforo (P) em isolados de fígado suíno (LIP) obtidos por precipitação isoelétrica.

Como pode ser observado através da Figura 2, o mineral dominante na composição dos isolados foi o ferro total, seguido de cálcio o que era esperado uma vez que o subproduto fígado é fonte destes micronutrientes. No entanto, a extração por solução salina aumentou o teor de sódio nos isolados, que se tornou o segundo maior mineral presente nos LIPsal, oriundo do NaCl utilizado para aumentar a força iônica da solução de extração.

As amostras de LIPaq apresentaram uma concentração ligeiramente maior para o ferro total, embora, de modo contrário, o ferro heme exibiu uma proporção maior para os LIPsal. Paula et al. (2022b) observaram o mesmo efeito em seu estudo. Os autores relataram que, amostras de isolado de coração suíno extraídas em soluções salinas apresentavam mais proporção de ferro heme.

A deficiência de ferro é a principal deficiência mineral em todo o mundo e foi identificada como uma das seis prioridades da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Reshan Jayawardena et al., 2022). O ferro heme é um mineral proveniente da hemoglobina e mioglobina, altamente biodisponível, sendo mais eficiente do que o ferro não heme encontrado em vegetais. A absorção de ferro heme é da ordem de 15 a 35%, enquanto o ferro não heme apresenta uma taxa de absorção de apenas 1 a 10% (Gomide et al., 2013; Pereira and Vicente, 2013; Ramos, E. and Gomide, L., 2017). Desta forma, pelo seu melhor aproveitamento, o ferro heme é fundamental para combater e prevenir a anemia ferropriva, comum em crianças, gestantes sem acompanhamento adequado de pré-natal e mulheres em idade fértil. A ingestão diária recomendada para o teor de ferro é de 10 mg por dia para um adulto (Honikel, 2011) saudável; portanto, o consumo dos LIP já seria suficiente para garantir mais de 100% das necessidades de ferro diária, como representado na figura 2.

Siebeinich et al. (2017) avaliaram a qualidade de uma mistura fortificante (FM), contendo fígado suíno preparado em pó. Os autores concluíram que o FM possui características que o tornam um excelente alimento fortificante, para uso nas refeições escolares principalmente em sopas, cremes, carnes cozidas e especialmente no feijão, uma preparação que faz parte dos hábitos alimentares brasileiros desde a infância. Srebernich et al. (2015) também avaliaram a qualidade de um bolo de carne desenvolvido com fígado suíno, onde obtiveram um aumento dos níveis especialmente de ferro e zinco, com aumentos de 126,0% para o ferro e 84,37% para o zinco em relação ao controle, fornecendo 15 e 20% das necessidades diárias desses minerais para crianças em idade pré-escolar, sendo uma opção viável para reduzir a incidência de anemia ferropriva.

Para o cálcio, as amostras apresentaram valores muito próximos, com concentração média de 34,5 mg/kg, sendo reportado por Honikel (2011) que o órgão fígado de suíno in natura apresenta cerca de 60 mg/kg. De maneira similar ao ferro, existe uma preocupação com o baixo teor de cálcio na dieta, comum em muitas populações. A ausência de cálcio contribui para o raquitismo nutricional/osteomalácia, osteoporose, osteopenia e hipocalcemia em crianças/adultos, além de aumentar o risco de vários problemas de saúde, como em gestantes (Heaney, 2000; Palacios et al., 2021). Desta forma, associado ao alto teor de ferro encontrado, os LIP também são sugestivos para a ingestão de cálcio na dieta, sendo estes encontrados na sua composição mineral.

Para o sódio, conforme esperado, os LIPsal demonstraram uma maior concentração de sódio em relação aos LIPaq. Tal efeito observado, é associado as soluções de extração utilizadas na etapa de recuperação da proteína. Desta forma, outras fontes deste mineral foram adicionadas aos isolados, como o NaCl e MgCl₂ (força iônica) e também o nitrito de sódio (cor), aumentando a concentração de sódio encontrada. No entanto, todos os valores encontrados para os tratamentos estão bem abaixo da meta estipulada pela Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA), juntamente com o Ministério da Saúde (MS) para o Brasil, que foi de 314 mg/g para produtos prontos, concentrados, elaborados à base de carnes e derivados (ABIA, 2017). Além disso, cabe também ressaltar que o fígado in natura pode conter cerca de 73-87 mg/g de sódio (Toldra, 2011).

Concentrações ligeiramente maiores de potássio foram observadas nos LIPsal, enquanto o teor de fósforo aumentou para os LIPaq. Assim como o cálcio, o fósforo, está presente nas membranas celulares, integrando a estrutura para a formação dos ossos e dentes, participando também ativamente do metabolismo e contração muscular (Tomović et al., 2019). Segundo Honikel (2011) e Seong et al. (2014) para fígados de diferentes espécies animais, incluindo o de suínos, além do ferro e cálcio, os minerais mais disponíveis são o fósforo (P), potássio (K) e zinco (Zn), nesta ordem.

A composição de aminoácidos para os LIP obtidos é descrita na Tabela 3 e os escores de aminoácidos essenciais (EAA) são representados na Figura 3. Foram encontrados todos os aminoácidos essenciais (EAA) em ambos os isolados, apresentando o isolado em solução aquosa um maior somatório.

Tabela 3. Composição (média \pm desvio padrão) de aminoácidos de isolados de fígados suínos, obtidos por precipitação isoeletrica utilizando solução de extração aquosa (LIPaq) e salina (LIPsal), ingestão diária recomendada (IDR)¹ para adultos, índice de aminoácidos essenciais (IAAE) e eficiência proteica (PER)

Aminoácidos	LIPaq	LIPsal	IDR/FAO
Essenciais, EAA (mg/g proteína)			
Histidina, His	22,86 \pm 0,81	19,79 \pm 0,45	15
Isoleucina, Ile	36,70 \pm 0,98	31,95 \pm 0,28	30
Leucina, Leu	72,85 \pm 1,52	63,89 \pm 0,6	59
Lisina, Lys	55,62 \pm 1,86	51,40 \pm 1,01	45
Metionina, Met	22,63 \pm 1,06	19,68 \pm 0,59	16 (22 [†])
Fenilalanina, Phe	39,74 \pm 0,17	35,37 \pm 0,26	30 [‡]
Treonina, Thr	36,37 \pm 1,13	32,06 \pm 0,39	23
Triptofano, Trp	9,91 \pm 0,09	8,51 \pm 0,46	6
Valina, Val	46,05 \pm 0,35	40,02 \pm 0,24	39
Σ EAA	342,73	302,66	
Não essenciais, NEAA (mg/g proteína)			
Alanina, Ala	44,47 \pm 1,46	38,58 \pm 0,81	
Arginina, Arg	48,19 \pm 1,94	42,34 \pm 0,88	
Asparagina, Asp	75,66 \pm 2,34	68,09 \pm 1,00	
Cisteína, Cis	11,82 \pm 0,03	10,61 \pm 0,05	
Glutamina, Glu	94,35 \pm 3,40	84,45 \pm 2,10	
Glicina, Gli	37,04 \pm 0,60	32,50 \pm 0,58	
Hidroxiprolina, Hip*	0,45 \pm 0,10	0,22 \pm 0,05	
Prolina, Pro	35,24 \pm 0,31	31,28 \pm 0,28	
Serina, Ser	35,58 \pm 1,07	31,50 \pm 0,12	
Taurina, Tau*	<i>nd</i>	<i>nd</i>	
Tirosina, Tyr	30,85 \pm 0,48	26,97 \pm 0,05	
Σ NEAA	413,66	366,56	
Total AA	756,39	669,22	
Índice de aminoácidos essenciais, IAAE (%)	40,55	35,30	
Razão de eficiência proteica (PER)	136,49	119,88	

¹ Padrão de referência da FAO/WHO (2007) calculado a partir das necessidades médias de aminoácidos e proteínas (0,66 g/kg por dia).

[†]Requerido para Metionina + Cisteína. [‡]Requerido para Fenilalanina + Tirosina.

*Aminoácidos não-padrão.

*Non-standard amino acids.

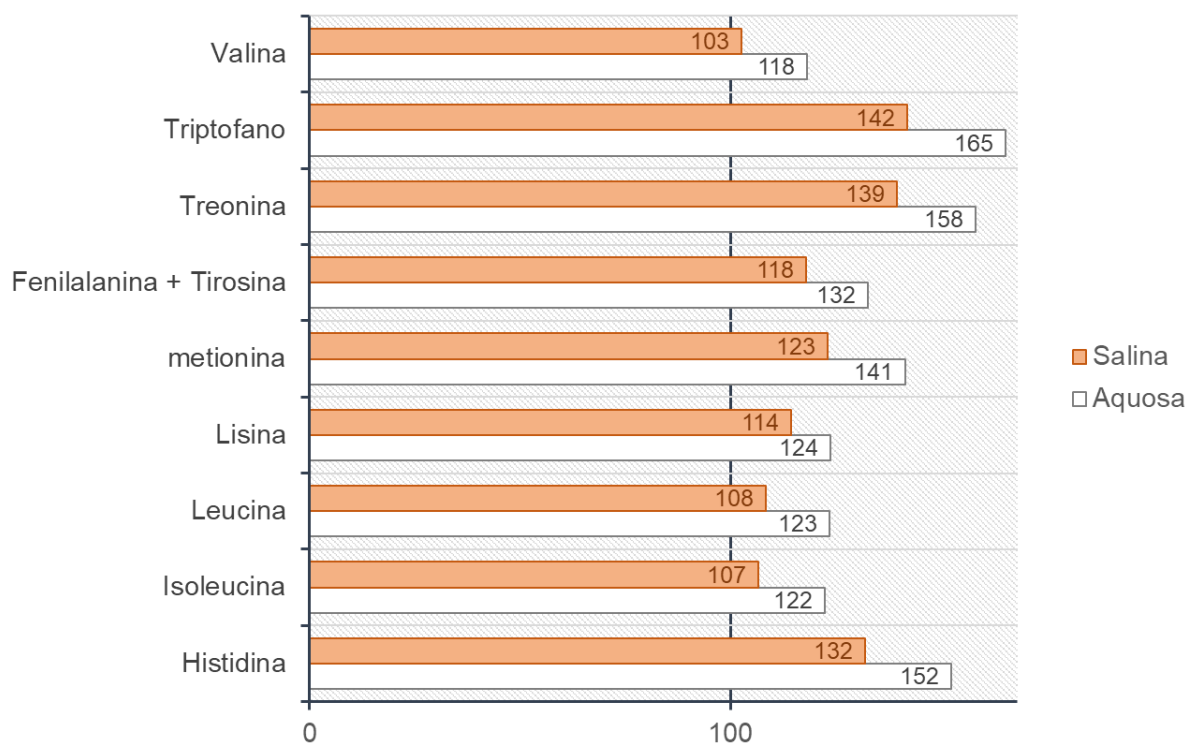


Figura 3. Efeitos da solução de extração (aquosa e salina) nos escores (AAES) de aminoácidos essenciais em isolados de fígado suíno (LIP) obtidos por precipitação isoelétrica.

As propriedades de nutrição das proteínas dependem principalmente de sua composição de aminoácidos. As amostras de LIP apresentaram todos os aminoácidos essenciais (EAA) em quantidades superiores (Tabela 3) aos recomendados pela FAO (2007) de ingestão diária (IDR). Além disto, de acordo com os valores obtidos para a eficiência proteica (PER) (acima de 100), ambos os isolados possuem estimativa de alta digestibilidade e conseqüentemente excelente qualidade proteica (Yang et al., 2018) .

É importante que a proteína apresente uma composição de aminoácidos bem distribuída, pois quando somente um é predominante, alterações individuais podem ocorrer, promovendo mudanças como no sabor final e textura do alimento (Hidalgo and Zamora, 2004; Jurado et al., 2007). Pearson and Dutson (1988), ao caracterizarem subprodutos de suínos, encontrara níveis variados de aminoácidos essenciais, mas todos foram associados como semelhantes aos dos tecidos musculares do suíno. Ainda, Aristoy and Toldrá (2009) encontrou, em subprodutos de origem animal, a presença de aminoácidos essenciais equilibrados e semelhantes aos das proteínas musculares.

Através da figura 3 pode-se observar os escores (AAES) para a composição aminoacídica de cada amostra, que de maneira geral, estas foram bem próximas e balanceadas. O aminoácido Triptofano (Trp) foi o que apresentou um maior AAES, seguido de Treonina (Thr), Histidina (His) e Metionina (Met). Segundo a FAO (2007), dentre os aminoácidos mais limitantes de estarem disponíveis em proteínas estão o Trp, Met e Lys. No entanto, Zou et al. (2018) em seu estudo também demonstraram que, havia uma quantidade desses e de todos EAA ao analisarem isolados de fígados suínos extraídos por precipitação isoelétrica e liofilizados. Segundo os autores, a quantidade de Thr, His e Met foi de 32,7%, 22,9% e 26,3, respectivamente. Valores muito próximos á composição de aos reportados para composição de aminoácidos foi identificado para os LIP (Tabela 4). Já Maluf et al. (2020), de modo contrário, encontraram menores quantidades de EAA ao hidrolisarem fígados de suíno, sendo identificados em primeira ordem os aminoácidos não essenciais, ácido glutâmico, ácido aspártico e o EAA leucina.

Portanto, as condições e métodos de extração proteica podem influenciar na composição e balanceamento dos aminoácidos e conseqüentemente da proteína. Neste estudo foi demonstrado que, isolados de fígados suínos independente da solução utilizada apresentaram uma composição completa, balanceada e com todos os EAA, caracterizando-se uma fonte proteica completa, de excelente qualidade e alto valor biológico.

4. Conclusão

Verificou que, a obtenção de isolados de fígados suínos extraídos por precipitação isoelétrica, ainda quando utilizadas soluções de maior força iônica e nitrito na etapa de recuperação, foi um método extremamente assertivo. A utilização de solução salina para a extração proteica do fígado permitiu a obtenção de isolados com maiores teores de proteínas, além de uma maior proporção de frações sal-solúveis. Ainda, quando os isolados com sal foram tratados com nitrito, apresentaram propriedades tecno-funcionais favorecidas, como a capacidade de retenção de óleo e o índice de atividade emulsificante, além de uma coloração menos intensa.

Quanto ás propriedades nutricionais, todos os isolados demonstraram excelentes quantidades de ferro total e heme, embora a maior fração obtida para heme fosse atribuída em solução salina. A carência de ferro é a principal deficiência mineral em todo o mundo, sendo

este micronutriente extremamente importante. Além disto, todos os aminoácidos essenciais foram encontrados em níveis maiores aos sugeridos.

Diante do exposto, isolados de fígados suínos representam uma alternativa de fonte proteica totalmente viável. E, a utilização deste novo ingrediente poderá possibilitar ainda mais agregação de valor aos subprodutos da indústria cárnea, tanto para fins de nutrição (proteína /biofortificante) como tecno-funcionais (emulsificante).

Referências

ABIA, 2017. Indústrias retiram mais de 17 mil toneladas de sódio dos alimentos. , Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. São Paulo.

Abril, B., Sanchez-Torres, E., Bou, R., Garcia-Perez, J., Benedito, J., 2021. Ultrasound intensification of Ferrochelataze extraction from pork liver as a strategy to improve ZINC-protoporphyrin formation. *Ultrasonics Sonochemistry* 78, 105703.

Abril, B., Sánchez-Torres, E.A., Toldrà, M., Benedito, J., García-Pérez, J.V., 2022. Physicochemical and Techno-Functional Properties of Dried and Defatted Porcine Liver. *Biomolecules* 12(7), 926.

Alsmeyer, R.H., RH, A., AE, C., ML, H., 1974. Equations predict PER from amino acid analysis.

Anzani, C., Boukid, F., Drummond, L., Mullen, A.M., Álvarez, C., 2020. Optimising the use of proteins from rich meat co-products and non-meat alternatives: Nutritional, technological and allergenicity challenges. *Food Research International* 137, 109575.

AOAC, 2012. Official Methods of Analysis, in: Chemists, A.o.O.A. Gaithersburg, MD: Ed. 19th ed, p. 1298.

Aristoy, M.C., Toldrá, F., 2009. Essential amino acids, *Handbook of seafood and seafood products analysis*. CRC Press, pp. 305-326.

Bergman, I., Loxley, R., 1963. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Analytical chemistry* 35(12), 1961-1965.

BRASIL, 2005. Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal (Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.

- Chatterjee, R., Dey, T.K., Ghosh, M., Dhar, P., 2015. Enzymatic modification of sesame seed protein, sourced from waste resource for nutraceutical application. *Food and Bioproducts Processing* 94, 70-81.
- Chevalier, R.C., Pizato, S., de Lara, J.A.F., Cortez-Vega, W.R., 2018. Obtaining protein isolate of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its application as coating in fresh-cut melons. *Journal of food safety* 38(5), e12496.
- Costa, C.G.C.d., Paula, M.M.d.O., Massingue, A.A., Torres Filho, R.d.A., Ramos, E.M., Carneiro, J.d.D.d.S., 2019. Protein concentrates obtained from pig by-products using pH-shifting technique: a preliminary study. *Ciência Rural* 49(6).
- da Costa, C.G.C., Paula, M.M.O., Massingue, A.A., Torres Filho, R.A., Ramos, E.M., Carneiro, J.D.S., 2019. Protein concentrates obtained from pig by-products using pH-shifting technique: a preliminary study. *Ciencia Rural*, 49.
- Darine, S., Christophe, V., Gholamreza, D., 2010. Production and functional properties of beef lung protein concentrates. *Meat Science* 84(3), 315-322.
- FAO, 2007. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 92, 1-66.
- FAO, 2018. The future of food and agriculture: alternative pathways to 2050. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Fennema, O.R., Damodaran, S., Parkin, K.L., 2017. Fennema's food chemistry. CRC press.
- Fonkwe, L., Singh, R., 1996. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. *Process biochemistry* 31(6), 605-616.
- Gomide, L.d.M., Ramos, E., Fontes, P., 2013. *Ciência e qualidade da carne: fundamentos*. Viçosa: Editora UFV, 155-185.
- Guimarães, A.S., Guimarães, J.S., Araújo, A.B.S., Rodrigues, L.M., Carvalho, E.E.N., Ramos, A.d.L.S., Ramos, E.M., 2021. Characterization of natural curing agents from Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) for their use in clean label restructured cooked meat products. *LWT* 150, 111970.

- Hagen, S.R., Frost, B., Augustin, J., 1989. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. *Journal of the association of Official analytical Chemists* 72(6), 912-916.
- Heaney, R.P., 2000. Calcium, dairy products, and osteoporosis. *Journal of the American college of nutrition* 19(sup2), 83S-99S.
- Hidalgo, F.J., Zamora, R., 2004. Strecker-type degradation produced by the lipid oxidation products 4, 5-epoxy-2-alkenals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(23), 7126-7131.
- Honikel, K., 2011. Composition and Calories In: Nollet LML, Toldrá F, editors. *Handbook of Analysis of Edible Animal By-Products*. CRC Press.
- Hornsey, H., 1956. The colour of cooked cured pork. I.—Estimation of the Nitric oxide-Haem Pigments. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 7(8), 534-540.
- Jayawardena, S.R., Morton, J.D., Brennan, C.S., Bekhit, A.E.D.A., 2019. Utilisation of beef lung protein powder as a functional ingredient to enhance protein and iron content of fresh pasta. *International Journal of Food Science & Technology* 54(3), 610-618.
- Jurado, Á., García, C., Timón, M.L., Carrapiso, A.I., 2007. Effect of ripening time and rearing system on amino acid-related flavour compounds of Iberian ham. *Meat Science* 75(4), 585-594.
- Kim, Y., Cheong, J., Yang, S., Lee, M., 1991. Functional properties of the porcine variety meats. *Korean Journal of Animal Sciences (Korea Republic)*.
- Lucas, B., Sotelo, A., 1980. Effect of different alkalies, temperature, and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. *Analytical biochemistry* 109(1), 192-197.
- Maluf, J.U., Fiorese, M.L., Maestre, K.L., Dos Passos, F.R., Finkler, J.K., Fleck, J.F., Borba, C.E., 2020. Optimization of the porcine liver enzymatic hydrolysis conditions. *Journal of Food Process Engineering* 43(4), e13370.
- Matak, K.E., Tahergorabi, R., Jaczynski, J., 2015. A review: Protein isolates recovered by isoelectric solubilization/precipitation processing from muscle food by-products as a component of nutraceutical foods. *Food Research International* 77, 697-703.

- Møller, J.K., Adamsen, C.E., Catharino, R.R., Skibsted, L.H., Eberlin, M.N., 2007. Mass spectrometric evidence for a zinc–porphyrin complex as the red pigment in dry-cured Iberian and Parma ham. *Meat science* 75(2), 203-210.
- Muir, P., Thomson, B., Askin, D., 2008. A review of dressing out percentage in New Zealand livestock. On-Farm Research Ltd.: Hastings, New Zealand, 1-88.
- Mullen, A.M., Álvarez, C., Zeugolis, D.I., Henchion, M., O'Neill, E., Drummond, L., 2017. Alternative uses for co-products: Harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. *Meat Science* 132, 90-98.
- Okezie, B.O., Bello, A., 1988. Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate. *Journal of Food science* 53(2), 450-454.
- Palacios, C., Hofmeyr, G.J., Cormick, G., Garcia-Casal, M.N., Peña-Rosas, J.P., Betrán, A.P., 2021. Current calcium fortification experiences: A review. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1484(1), 55-73.
- Park, S., Brewer, M., Novakofski, J., Bechtel, P., McKeith, F., 1996. Process and characteristics for a surimi-like material made from beef or pork. *Journal of Food Science* 61(2), 422-427.
- Paula, M.M.d.O., Buchili, A.F.M., Fontes, P.R., Ramos, A.d.L.S., Ramos, E.M., 2022a. Extraction of proteins from aqueous and salt solutions of porcine edible by-products using the pH-shifting technique. *Food and Bioproducts Processing* . (Manuscript 01).
- Paula, M.M.d.O., Haddad, G.d.B.S., Rodrigues, L.M., Júnior, A.A.B., Ramos, A.d.L.S., Ramos, E.M., 2019. Effects of PSE meat and salt concentration on the technological and sensory characteristics of restructured cooked hams. *Meat science* 152, 96-103.
- Paula, M.M.d.O., Moura, A.P.R.d., Andrade, B.F., Benevenuto Júnior, A.A., Ramos, A.d.L.S., Ramos, E.M., 2022b. Nutritional and technofunctional characterization of protein isolates obtained from porcine heart. *Meat science*.
- Pearson, A.M., Dutson, T.R., 1988. *Edible meat by-products*. Elsevier Applied Science.
- Pereira, P.M.d.C.C., Vicente, A.F.d.R.B., 2013. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science* 93(3), 586-592.
- Ramos, E., Gomide, L., 2017. *Avaliação da Qualidade de Carnes: Fundamentos e Metodologías*: Editorial Viçosa UFV.

- Ramos, E.M., Gomide, L.A.M., 2017. Avaliação da qualidade de carnes: Fundamentos e metodologias, 2a ed. Editora UFV, Viçosa.
- Reshan Jayawardena, S., Morton, J.D., Bekhit, A.E.-D.A., Bhat, Z.F., Brennan, C.S., 2022. Effect of drying temperature on nutritional, functional and pasting properties and storage stability of beef lung powder, a prospective protein ingredient for food supplements. *LWT* 161, 113315.
- Schubring, R., 2009. Colour measurement. *Fishery products: quality, safety and authenticity*, 127-172.
- Selmane, D., Christophe, V., Gholamreza, D., 2008. Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties. *Meat Science* 79(4), 640-647.
- Seong, P.N., Park, K.M., Cho, S.H., Kang, S.M., Kang, G.H., Park, B.Y., Moon, S.S., Van Ba, H., 2014. Characterization of edible pork by-products by means of yield and nutritional composition. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 34(3), 297.
- Shahidi, F., Samaranyaka, A., Pegg, R., 2014. Curing| Brine Curing of Meat.
- Siebeinich, S.M., Gonçalves, G.M.S., Domene, S.M.Á., 2017. Fortifying pork liver mixture: Evaluation of protein quality and iron bioavailability--Part 2/Mistura fortificadora a base de fígado suíno: avaliação da qualidade proteica e da biodisponibilidade de ferro--Parte 2. *Revista de Nutrição* 30(6), 817-827.
- Srebernich, S.M., Gonçalves, G.M.S., Domene, S.M.Á., 2018. Fortifying pork liver mixture: preparation and physicochemical characteristics - Part 1. *Food Science and Technology* 38, 647-652.
- Srebernich, S.M., Silveira, E.T.F., Gonçalves, G.M.S., Ormenese, R.d.C.S.C., Morgano, M.A., 2015. Development and evaluation of iron-rich meatloaves containing pork liver for schoolchildren. *Food Science and Technology* 35, 460-467.
- Steen, L., Glorieux, S., Goemaere, O., Brijs, K., Paelinck, H., Foubert, I., Fraeye, I., 2016. Functional properties of pork liver protein fractions. *Food and Bioprocess Technology* 9(6), 970-980.
- Toldra, F., 2011. -Food-Grade Proteins from Animal By-Products: Their Usage and Detection Methods, *Handbook of analysis of edible animal by-products*. CRC Press, pp. 28-51.

- Toldrà, M., Parés, D., Sagner, E., Carretero, C., 2020. Utilisation of protein fractions from porcine spleen as technofunctional ingredients in emulsified cooked meat sausages. *International Journal of Food Science & Technology* 55(2), 871-877.
- Tomović, V., Šojić, B., Jokanović, M., Škaljac, S., Ivić, M., Tomović, M., Tomašević, I., Stajić, S., Martinović, A., 2019. Mineral contents in pork and edible offal from indigenous pigs. *Journal of engineering & processing management* 11(1), 66-72.
- Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A., 2004. A Zn-porphyrin complex contributes to bright red color in Parma ham. *Meat Science* 67(1), 95-100.
- Yang, F., Huang, X., Zhang, C., Zhang, M., Huang, C., Yang, H., 2018. Amino acid composition and nutritional value evaluation of Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) and its protein subunit. *RSC advances* 8(5), 2653-2659.
- Zhu, Y., Bao, M., Chen, C., Yang, X., Yan, W., Ren, F., Wang, P., Wen, P., 2021. Comparison of the Nutritional Composition of Bullfrog Meat from Different Parts of the Animal. *Food Science of Animal Resources* 41(6), 1049.
- Zou, Y., Bian, H., Li, P., Sun, Z., Sun, C., Zhang, M., Geng, Z., Xu, W., Wang, D., 2018. Optimization and physicochemical properties of nutritional protein isolate from pork liver with ultrasound-assisted alkaline extraction. *Animal Science Journal* 89(2), 456-466.