



Método para a Determinação da Solubilidade Protéica em Pepsina 0,0002%

Dirceu Luís Zanotto¹
Claudio Bellaver²

1. Introdução

Os laboratórios que executam o método de determinação da solubilidade protéica em pepsina de farinhas animais, geralmente se baseiam na recomendação da Association of Official Analytical Chemists (1995), a qual indica que o teste deve ser feito com solução de Pepsina a 0,2% e uma atividade de 1:10000. Estudos mais recentes (Parsons et al., 1997 e Bellaver et al., 2000), mostram que existem diferenças em solubilidade da proteína bruta (PB) ($N \times 6,25$), quando digeridas em pepsina nas concentrações de 0,2%, 0,02%, 0,002% ou 0,0002%. Ademais, foi proposto por Bellaver et al (2000) que o uso da pepsina na concentração de 0,0002% melhora a sensibilidade no processo discriminatório de

qualidade de farinhas, promovendo maior diferença entre os valores da proteína solúvel para farinhas com diferentes qualidades protéicas (Tabela 1). O presente trabalho tem como objetivo disponibilizar uma descrição detalhada do método de determinação da solubilidade protéica de farinhas de subprodutos animais, baseado na recomendação da Association of Official Analytical Chemists (1995), considerando as alterações propostas por Bellaver et al. (2000).

Tabela 1 – Efeitos da concentração de Pepsina sobre o percentual de proteína solúvel em Farinhas de Carne e Ossos (FCO)¹

Concentração de Pepsina (%)	Proteína solúvel (%)		Diferença em proteína solúvel
	FCO com baixa PB ²	FCO com alta PB	
0,0002	33,76	78,68	44,92
0,002	65,29	87,05	21,76
0,02	90,95	91,97	1,02
0,2	90,96	91,97	1,01

¹ Adaptado de Bellaver et al. (2000);

² PB, significa proteína bruta.

¹ Biólogo, MSc. Pesquisador Embrapa Suínos e Aves.

² Méd. Vet., PhD. Pesquisador Embrapa Suínos e Aves.

2. Campo de Aplicação

O presente procedimento aplica-se à determinação da solubilidade protéica de farinhas de subprodutos animais, tais como: farinha de carne e ossos, farinha de vísceras, farinha de penas, farinha de sangue e farinha de peixes.

3. Princípio

Uma amostra de farinha de subproduto animal, após ter sido desengordurada, é submetida à digestão com solução de pepsina/ácido, sob condições de tempo, temperatura e agitação, controladas. Após a digestão, a amostra é centrifugada com subsequente filtração do sobrenadante, sendo a proteína solúvel ($N \times 6,25$) determinada no extrato filtrado e o coeficiente de solubilidade protéica calculado em relação ao teor de proteína bruta da amostra original.

4. Materiais/Equipamentos, Reagentes e Soluções

4.1. Materiais/Equipamentos

- Todos os materiais e equipamentos utilizados na determinação do nitrogênio total Kjeldahl ou proteína bruta ($N \times 6,25$);
- Moinho;
- Peneira ABNT nº 20 (0,841 mm);
- Conjunto completo para extração de gordura (soxlet ou similar);
- Balança analítica;
- Papel de pesagem 10 x 10 cm (tipo manteiga);
- Agitador tipo Wagner (Figura 1);
- Frasco para digestão: frasco de penicilina com capacidade para 100 ml, com tampa de borracha (Figura 1);
- Estufa para temperatura de $45 \pm 2^\circ\text{C}$;
- Centrífuga para 2.500 r.p.m.;
- Tubo para centrífuga com capacidade para 100 ml;
- Papel de filtro com porosidade média e 11 cm de diâmetro;
- Pipetador com capacidade para 15ml;
- Dosador de soluções/reagentes, tipo

“dispenser” ou equivalente, com capacidade para 75ml;

- Balão volumétrico com capacidade para 1000ml;
- Balão volumétrico com capacidade para 100ml.



Figura 1 - Agitador tipo Wagner com agitação rotativa e frascos tipo penicilina.

4.2. Reagentes

- Todos os reagentes utilizados na determinação de nitrogênio total Kjeldahl ou proteína bruta ($N \times 6,25$);
- Ácido clorídrico p.a.;
- Pepsina com atividade digestiva de 1:10000, código Sigma P 7000.

4.3. Soluções

- Todas as soluções utilizadas na determinação de nitrogênio total Kjeldahl ou proteína bruta ($N \times 6,25$);
- Solução de ácido clorídrico 6 N: em um balão volumétrico de 100ml contendo aproximadamente 40ml de água destilada, adicionar exatamente 51,5ml de ácido clorídrico concentrado (HCL 36% e gravidade específica de 1,18 g/ml), misturar, esfriar a temperatura ambiente e completar o volume com água destilada;
- Solução de ácido clorídrico 0,0744 N: em um balão volumétrico de 1000ml contendo aproximadamente 700ml de água destilada, adicionar 12,4ml da solução de ácido clorídrico 6 N, misturar e completar o volume com água destilada;

- Solução ácido-pepsina 0,02 %: pesar 20 mg de pepsina (atividade digestiva de 1 : 10.000) e dissolver em um beacker de 100 ml contendo, aproximadamente, 50ml da solução de ácido clorídrico 0,0744 N. Transferir quantitativamente o conteúdo do beacker para um balão volumétrico de 100 ml, lavando as paredes do beacker com pequenas porções da solução de ácido clorídrico 0,0744 N e completar o volume com essa solução.
- Solução ácido-pepsina 0,0002 %: em um balão volumétrico de 1000 ml, transferir 10 ml da solução ácido-pepsina 0,02 % e completar o volume com ácido clorídrico 0,0744 N.

Obs.: As soluções ácido-pepsina devem ser preparadas imediatamente antes do uso.

5. Operação

5.1. Preparo da amostra

- Homogeneizar a amostra e retirar uma porção de aproximadamente 100 g;
- Peneirar a amostra em peneira ABNT nº 20 (0,841 mm);
- Moer a fração retida na peneira e repetir o procedimento até que toda a amostra passe através das malhas da peneira. A moagem deverá ser realizada de modo que a temperatura da amostra não aumente mais do que 10°C;
- Homogeneizar bem a amostra e acondicioná-la para a execução da análise.

5.2. Procedimento Analítico

- Pesar 1,00 ± 0,01 g da amostra preparada e registrar o peso na planilha da análise;
- Desengordurar a amostra conforme procedimento Soxlet utilizado para extrato etéreo;
- Transferir quantitativamente a amostra desengordurada para um frasco de penicilina devidamente limpo e identificado;
- Adicionar 75 ml da solução ácido-pepsina 0,0002 %, tampar o frasco e suspender a amostra por meio de movimentos de inversão do frasco,

- certificando-se de que toda a amostra esteja em contato com a solução;
- Conectar o frasco com a amostra ao agitador Wagner e levar o conjunto à estufa, alí mantendo por 16 h, a temperatura de 45 ± 2°C e agitação constante de 15 r.p.m., conforme ilustra a Figura 2;
- Após a digestão, transferir o conteúdo do frasco para um tubo de centrifuga e realizar a centrifugação com 2.500 r.p.m. por 15 minutos;
- Filtrar o sobrenadante e transferir uma alíquota de 15 ml do extrato filtrado para um tubo de digestão de proteína;
- Proceder a determinação da proteína bruta da alíquota do extrato filtrado e da amostra original, conforme o procedimento de determinação do nitrogênio total Kjeldahl ou proteína bruta (N x 6,25). Paralelamente realizar uma prova em branco envolvendo as soluções utilizadas.



Figura 2 - Estufa com temperatura controlada, contendo o agitador do tipo Wagner com amostras.

5.3. Cálculos

$$\text{PBAO (\%)} = \frac{(V_a - V_b) \times F \times N \times 6.25 \times 0.014 \times 100}{P}$$

$$\text{PBEA (\%)} = \frac{(V_a - V_b) \times F \times N \times 5 \times 6.25 \times 0.014 \times 100}{P}$$

$$\text{CSPBPEPH (\%)} = \frac{\text{PBEA}}{\text{PBAO}} \times 100$$

onde:

- PBAO = Proteína bruta na amostra original;
- PBEA = Proteína bruta no extrato da amostra;
- CSPBPEPH = Coeficiente de solubilidade da proteína bruta em pepsina (0,0002%) ácido (HCl 0,0744N);
- Va = Volume de ácido sulfúrico utilizado na titulação da amostra;
- Vb = Volume de ácido sulfúrico utilizado na titulação da prova em branco;
- F = Fator de correção para padronização do ácido sulfúrico;
- N = Normalidade do ácido sulfúrico;
- 5 = Fator de correção para expressar o teor de proteína no total da amostra (15 x 5 = 75 ml);
- 6,25 = Fator de conversão do nitrogênio total para proteína, considerando 16% de nitrogênio na molécula de proteína, então: $100 / 16 = 6,25$;
- 0,014 = Miliequivalente grama do nitrogênio;
- P = Peso da amostra em gramas.

BELLAVER, C.; ZANOTTO, D.L.; GUIDONI, A.L.; KLEIN, C.H. In vitro solubility of meat and bone meal protein with different pepsin concentrations. *Ciência Rural*, v.30, n.3, p.489-492, 2000.

PARSONS, C. M., CASTANON, F., HAN, Y. Protein and amino acid quality of meat and bone meal. *Poultry Science*, v.76, p. 361-368. 1997.

6. Referências Bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Pepsin digestibility of animal protein feeds. In: _____. *Official methods of analysis of AOAC international*. 16. ed. Arlington: AOAC, 1995. v. 1, Cap. 4, p. 15 - 16.

Comunicado Técnico, 402

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Suínos e Aves
Endereço: Br 153, Km 110,
Vila Tamanduá, Caixa postal 21,
89700-000, Concórdia, SC
Fone: 49 3441 0400
Fax: 49 3442 8559
E-mail: sac@cnpsa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2005): tiragem: 100

Comitê de Publicações

Presidente: Jerônimo Antônio Fávero
Membros: Claudio Bellaver, Cícero Juliano Monticelli, Gerson Neudi Scheuermann, Airton Kunz, Valéria Maria Nascimento Abreu.
Suplente: Arlei Coldebella

Revisores Técnicos

Cícero J. Monticelli, Paulo A.R. de Brum, Gerson N. Scheuermann

Expediente

Supervisão editorial: Tânia Maria Biavatti Celant.
Editoração eletrônica: Simone Colombo.
Normalização bibliográfica: Irene Z. P. Camera.