



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



TIAGO LINUS SILVA COELHO

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA CARNE
CAPRINA UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL E METODOLOGIA DE
SUPERFÍCIE RESPOSTA**

TERESINA-PI

2017

TIAGO LINUS SILVA COELHO

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA CARNE
CAPRINA UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL E METODOLOGIA DE
SUPERFÍCIE RESPOSTA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira

Co-orientador: Prof. Dr. Samuel Anderson Alves de Sousa

TERESINA-PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial do CCN

C672o Coelho, Tiago Linus Silva.
Otimização do método de extração de proteínas da carne caprina utilizando planejamento fatorial e metodologia de superfície resposta / Tiago Linus Silva Coelho. – Teresina, 2017.
79f. il. Color

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Natureza, Pós-Graduação em Química, 2017.
Orientador: Prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira.

1. Carne Caprina - Análise. 2. Análise Quantitativa - Proteínas. I. Título

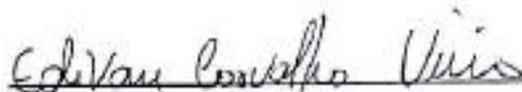
CDD 545

TIAGO LINUS SILVA COELHO

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA CARNE
CAPRINA UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL E METODOLOGIA DE
SUPERFÍCIE RESPOSTA**

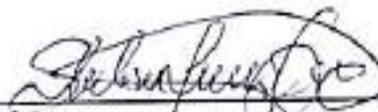
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos necessários para
obtenção do título de Mestre em Química, na área de concentração de Química
Analítica.

BANCA EXAMINADORA

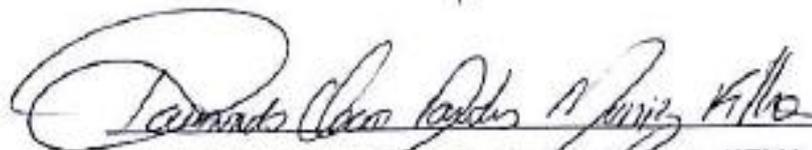


Prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira - UFPI (Presidente)

Prof. Dr. Janildo Lopes Magalhães - UFPI (Titular)



Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos - UFPB (Titular)



Prof. Dr. Raimundo Clécio Dantas Muniz Filho - UEMA (Suplente)

Esta dissertação é dedicada a Deus e minha família, com amor, admiração e gratidão.

Agradecimentos

- ✓ Em primeiro lugar a DEUS pelo dom da vida e pela dádiva de me proporcionar a realização desse sonho.
- ✓ Aos meus pais, Maria de Jesus e Silva Coelho e Antonio dos Santos Coelho pela esforço e dedicação destinados à minha educação moral e intelectual. Por todo amor, apoio e confiança que me deram onde foram necessários em todas as minhas decisões.
- ✓ A minha irmã Taisa Hália Silva Coelho por toda a doação, amor e carinho que tens por mim.
- ✓ A minha namorada Celyane, pelo amor, companheirismo, compreensão e cuidado nos momentos difíceis.
- ✓ A toda minha família, pelo incentivo e apoio dado durante toda a trajetória de minha vida até hoje.
- ✓ Ao meu orientador e amigo prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira, agradeço pela oportunidade de realizar este trabalho, confiança depositada em mim, respeito nestes anos de convivência e condução dos meus passos desde o primeiro momento dentro da UFPI.
- ✓ Ao meu co-orientador prof. Dr. Samuel Anderson Alves de Sousa pela amizade, parceria e pelas muitas horas de discussões e conversas que tanto contribuíram para meu amadurecimento científico, acadêmico e pessoal.
- ✓ Ao prof. Dr. Cícero Alves Lopes Junior por me guiar dentro e fora do laboratório com várias conversas e ensinamentos que colaboraram para minha formação.

- ✓ Aos amigos Francislene Machado e Mikael Kelvin pela amizade, companheirismo e por compartilhar comigo as muitas horas de laboratório durante a realização dos experimentos.

- ✓ A todos os amigos que fiz durante o Mestrado em Química, amizades estas que contribuíram para que esses dois anos fossem alegres e proveitosos, em especial: Tomas Magno, Cleane Paz, Dino, Jaelson, Francisco Ivan, Ronaldo, Milton Falcão, Ezio Raul, Jonatas, Barbara, Thabata, Marluce, Jardes, Darlisson, Jane, Christian, Maelson e Nielson.

- ✓ Aos meus amigos da minha cidade natal “Valença do Piauí”, Roberto, Décio, Denilson, Wilton, Awyk, Samoel e Felipe.

- ✓ Ao Programa de Pós-Graduação em Química pela infraestrutura fornecida e às instituições de fomento CAPES e FAPPEPI pela concessão da bolsa de pesquisa.

- ✓ Por fim, a todas as pessoas que não foram citadas, mas contribuíram de alguma forma para a realização e conclusão deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

*“Aja como se tudo dependesse de você,
sabendo bem que, na realidade, tudo depende
de Deus...”*

Santo Inácio de Loyola

Publicações Oriundas no Período do Mestrado

Divulgação em reuniões científicas

- ✓ COELHO, T. L. S.; MENDES, M. K. A.; BRAGA, F. M. S.; OLIVEIRA, C. B. S.; MUNIZ FILHO, R. C. D.; LOPES JUNIOR, C. A.; SOUSA, S. A. A.; VIEIRA, E. C. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA CARNE DE CAPRINOS EMPREGANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis - SC.
- ✓ COELHO, T. L. S.; SOUSA, S. A. A.; LOPES JUNIOR, C. A.; VIEIRA, E. C. O EFEITO DA FORÇA IÔNICA NA PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DA CARNE CAPRINA. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis - SC.
- ✓ BRAGA, F. M. S.; COELHO, T. L. S.; SOUSA, S. A. A.; MUNIZ FILHO, R. C. D.; BARBOSA, H. S.; LOPES JUNIOR, C. A. EMPREGO DE PLANEJAMENTO FATORIAL NO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EM SEMENTES DE FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADO. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis - SC.
- ✓ BRAGA, F. M. S.; COELHO, T. L. S.; BARBOSA, H. S.; LOPES JUNIOR, C. A. ESTUDO DA INFLUENCIA DE AGENTES PRECIPITANTES NO PERFIL CROMATOGRÁFICO DE PROTEÍNAS DO FEIJÃO-CAUPI. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis - SC.
- ✓ SAMPAIO, B. A.; LOPES JUNIOR, C. A.; COELHO, T. L. S.; BARBOSA, H. S. AVALIAÇÃO PROTEÔMICA COMPARATIVA EM SEMENTES DE DIFERENTES CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). OBTIDAS POR MELHORAMENTO GENÉTICO. In: 18º Encontro de Química Analítica, 2016, Florianópolis - SC.

Resumo

COELHO, T. L. S. **Otimização do método de extração de proteínas da carne caprina utilizando planejamento fatorial e metodologia de superfície resposta.** 2017. 79 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

Atualmente a produção de caprinos vem ganhando destaque no mundo inteiro. A carne destes animais apresenta características nutricionais interessantes como baixos teores de gorduras e colesterol, além de elevado teor de ferro e proteínas. A análise quantitativa das proteínas tem exigido um maior cuidado no preparo da amostra, tendo em vista que estas são moléculas complexas. Diante disto, o presente estudo tem como objetivo otimizar as condições de extração de proteínas da carne de caprinos, no que diz respeito à temperatura, tempo de extração, volume e concentração do extrator, empregando planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta. Aplicou-se um planejamento fatorial 2^4 para a triagem das variáveis e após este fez-se um novo planejamento composto de face centrada. A carne foi liofilizada, homogeneizada, e a seguir fez-se a extração das proteínas com Tris/HCl, pH 7,3 nas temperaturas, volumes, tempos de extração e concentração do extrator estabelecidos pelos planejamentos experimentais. Após esta etapa centrifugou-se e lavou-se o extrato obtido com éter de petróleo. Obteve-se como resposta o teor total de proteína extraída, quantificada pelo método de Bradford. O resultado do planejamento 2^4 mostrou que os fatores: temperatura, tempo de extração e volume do extrator foram significativos ao nível de 95% de confiança, além das interações entre o volume do extrator e tempo de extração, tempo e temperatura de extração, temperatura e volume de extrator. A concentração do extrator não demonstrou ser significativa, sendo posteriormente fixada em nível conveniente de acordo com a interpretação do seu efeito. O modelo quadrático proposto (planejamento composto de face centrada) não apresentou falta de ajuste e obteve um coeficiente de determinação de 0,96, o que significa que o modelo explica 96% da variância total dos dados ao redor da média. Adicionalmente, um teste *t* de comparação entre médias mostrou que não houve diferença significativa entre os teores de proteínas extraídos no ponto central (19,29 mg/100 g) e no ponto máximo estimado pelo modelo (19,58 mg/100 g). As condições ótimas para o método proposto foram de: 0,05 mol L⁻¹ para concentração do extrator, tempo de extração de 10 minutos, temperatura de 44°C e volume do extrator de 3,5 mL. O teor de proteína extraída nas condições ótimas foi significativamente maior do que alguns relatados na literatura. Os cromatogramas dos extratos obtidos para as temperaturas estudadas sugerem que o perfil cromatográfico das proteínas não sofre grande mudança com a variação da temperatura. O método proposto revela ser não destrutivo para as proteínas, simples, rápido e barato podendo ser usado em investigações proteômicas e para produzir concentrados confiáveis de proteínas da carne caprina.

Palavras-Chave: planejamento fatorial; metodologia de superfície resposta; otimização; proteínas; carne caprina.

Abstract

COELHO, T. L. S. **Optimization of the protein extraction method of goat meat employing factorial design and response surface methodology.** 79 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

Nowadays, the goats' production has been increasing significantly worldwide. The meat of these animals shows interesting nutritional characteristics, such as, low fat and cholesterol levels, besides high iron and protein content. The quantitative analysis of proteins has required a properly sampling, regarding the complexity of these molecules. In this context, the aim of the present study is perform an optimization of the protein extraction conditions with respect to: temperature; time of extraction; volume and concentration of the extractor agent, by applying factorial design and response surface methodologies. A 2^4 factorial design was employed in order to accomplish a variable screening, being followed by a 2^3 + central point + axial points design. The meat was freeze dried, homogenized and subsequently extracted its proteins by using Tris/HCl, pH 7,3 at temperatures, volumes, extraction times and concentration of the extractor one set by the experimental designs. After this step the obtained extract was centrifuged and washed with petroleum ether. The response was the total extracted protein content, quantifying by Bradford method. The 2^4 experimental design results showed as significantly at 95% confidence level, the factors: temperature; extraction time; e extractor volume, besides the second order interactions between: extractor volume and time; temperature and extractor volume; and temperature and time. The extractor concentration was not significant and in the following experiments it was maintained at a proper level according to the interpretation of its effect. The proposed quadratic model (2^3 + central point + axial points) did not show significant lack of fit and also it achieved a coefficient of determination equal to 0.96, which means that 96% of the total variance around the mean was explained by the model. Furthermore, a two tailed *t* test showed that there was no significant difference between the extracted protein content at the central point (19.29 mg/100 g) and that one (19.58 mg/100 g) at the critical point pointed out by the model. The optimal conditions were as follow: 10 minutes; temperature at 44 °C; and volume of extractor agent of 3.5 mL. In this work, the extracted protein content at optimal point was significantly higher than other reports from literature. The chromatograms of extracts obtained for the studied temperatures suggested that the protein chromatographic profile did not suffer serious modifications with the temperature variation. The proposed method reveals to be non-destructive to proteins, simple, fast and cheap, and may be used in proteomic investigations, besides to produce reliable goat protein concentrates.

Keywords: factorial design; response surface methodology; optimization; protein; meat goat.

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema do processo de otimização através de planejamentos fatoriais	29
Figura 2 - Modelo cúbico de face centrada	34
Figura 3 - Princípio da cromatografia de exclusão por tamanho	36
Figura 4 - Efeitos e interações estimadas. *Efeitos significativos	47
Figura 5 - Gráfico cúbico das respostas em função das variáveis: tempo, temperatura e volume, usando o nível menor da concentração do extrator (X_2 no nível baixo)	48
Figura 6 - Gráfico de valores experimentais versus valores previstos do modelo linear de interação	50
Figura 7 - Gráfico de resíduos do modelo linear de interação	53
Figura 8 - Superfície de resposta mantendo o tempo de extração no nível baixo (-1)	54
Figura 9 - Superfície de resposta mantendo o tempo de extração no ponto central (0)	54
Figura 10 - Gráfico de valores experimentais versus valores previstos do modelo quadrático	57
Figura 11 - Gráfico de resíduos do modelo quadrático	57
Figura 12 - Superfície de resposta do modelo quadrático mantendo o tempo de extração no nível baixo (-1)	59
Figura 13 - Superfície de resposta do modelo quadrático mantendo o volume do extrator no ponto central (0)	60
Figura 14 - Superfície de resposta do modelo quadrático mantendo o tempo de extração no ponto central (0)	60
Figura 15 - Cromatograma do padrão blue dextran com detecção no comprimento de onda de 280 nm	64
Figura 16 - Cromatograma de todos os padrões com detecção no comprimento de onda de 280 nm	65
Figura 17 - Curva de calibração da coluna de exclusão por tamanho	66
Figura 18 - Perfil HPLC-SEC-DAD com detecção no comprimento de onda de 280 nm para os extratos da carne caprina obtidos nas temperaturas de 30, 40 e 50°C ..	67

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Resultados do planejamento fatorial 2^2	30
Tabela 2 - Variáveis e níveis do planejamento fatorial completo 2^4	41
Tabela 3 - Variáveis e níveis do planejamento fatorial 2^3 com ponto central	41
Tabela 4 - Condições cromatográficas empregadas na análise de proteínas	43
Tabela 5 - Planejamento fatorial completo 2^4 para extração de proteínas (teor de proteína em mg g^{-1})	46
Tabela 6 - Efeitos calculados	46
Tabela 7 - ANOVA para o planejamento 2^4	49
Tabela 8 - Planejamento fatorial 2^3 + ponto central (teor de proteína em mg g^{-1})	51
Tabela 9 - ANOVA para o planejamento 2^3 + ponto central	52
Tabela 10 - Planejamento composto central de face centrada (teor de proteína em mg g^{-1})	56
Tabela 11 - ANOVA para o planejamento composto de face centrada.....	59
Tabela 12 - Planejamento fatorial 2^3 + ponto central + pontos axiais (teor de proteína em mg g^{-1})	57

Lista de Equações

Equação 1	31
Equação 2	31
Equação 3	31
Equação 4	32
Equação 5	33
Equação 6	33
Equação 7	34
Equação 8	49
Equação 9	53
Equação 10	58
Equação 11	61
Equação 12	65

Lista de Acrônimos e Abreviaturas

ANOVA: Análise de Variância, do inglês *Analysis of Variance*

AOAC: Associação Oficial dos Químicos Analíticos, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*

DAD: Detector de arranjo de diodos, do inglês *Diode Array Detector*

Ca. Cerca de

EP: Erro puro

Faj: Falta de ajuste

FAO: Organização da Agricultura e Alimentação das Nações Unidas

HPLC: Cromatografia líquida de alta performance, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

kDa: Quilo Dalton, unidade de massa

LLE: Extração líquido-líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extration*

MQ: Média quadrática

pH: Potencial Hidrogeniônico

R: Regressão

r: Resíduo

R²: Coeficiente de determinação

RSM: Metodologia de Superfície de Resposta, do inglês *Response Surface Methodology*

SEC: Cromatografia de exclusão por tamanho, do inglês *Size Exclusion Chromatography*

SPE: Extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SQ: Soma quadrática

Tris: Trihidroxiaminometano

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
3 OBJETIVOS	20
3.1 Geral	20
3.2 Específicos	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Carne caprina	21
2.2 Proteínas	22
2.2.1 Propriedades funcionais	23
2.2.2 Propriedades nutricionais	24
2.3 Preparo de amostra na extração de proteínas	25
2.4 Quimiometria	27
2.4.1 Notações	28
2.4.2 Planejamento fatorial.....	28
2.4.3 Metodologia de superfície resposta.....	32
2.5 Cromatografia de exclusão por tamanho	35
4 PARTE EXPERIMENTAL	38
4.1 Reagentes e solventes	38
4.2 Equipamentos	38
4.3 Materiais	39
4.4 Amostragem e preparo da amostra	39
4.5 Método de extração das proteínas de carne caprina	40
4.6 Planejamento fatorial	40
4.7 Determinação do teor total de proteínas	42
4.8 Análises cromatográficas	42
4.9 Análises dos dados	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Planejamento fatorial 2⁴	44
5.2 Planejamento fatorial 2³ com ponto central	51
5.3 Planejamento composto central de face centrada	55
5.4 Avaliação do efeito da temperatura no perfil proteômico por HPLC-SEC- DAD	63
6 CONCLUSÕES	68
6.1 Sugestões para trabalhos futuros	70
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

O rebanho de caprinos vem ao longo dos anos ascendendo, de maneira a competir com aqueles convencionais, por exemplo, o rebanho bovino. Segundo estimativas da Organização da Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO, 2014), em 2004 o rebanho mundial de caprinos era cerca de 850 milhões de animais, já em 2014, foi observado um aumento de 18%, no qual a quantidade de animais foi ca. 1 bilhão. Sobre a distribuição continental do rebanho, destaque para a Ásia, África e Américas com 60,2%, 32,9%, 4,3%, respectivamente, da população mundial de caprinos. O rebanho da Europa e a Oceania representam 2,2% e 0,4%, respectivamente.

O crescimento no número de animais no decorrer dos anos, pode ser atribuído a qualidade desta carne quando comparada às demais opções de carnes vermelhas disponíveis. A carne de caprinos contém baixos teores de ácidos graxos saturados e colesterol, sendo, então, considerada uma “carne magra”. Os teores de ferro e proteínas da carne caprina são similares aos da bovina, porém os teores de aminoácidos essenciais como, lisina, treonina, triptofano são superiores. Dentre todas essas características destaca-se o elevado teor de proteínas, as quais são essenciais para a manutenção funcionamento dos organismos (MADRUGA *et al.*, 2006).

No tocante as informações disponíveis sobre a carne caprina, nota-se que ainda são limitadas, principalmente, aquelas sobre o potencial nutritivo deste tipo de carne como componente da dieta humana, sendo, então, necessário mais estudos visando explorar de forma abrangente suas características. Assim, tais informações irão emprestar a sociedade uma maior consciência sobre a carne caprina, conseqüentemente, sua participação na cadeia produtiva tenderá a se tornar maior (SABOW *et al.*, 2015). Todavia, a análise de alimentos é uma tarefa bastante complexa devida a diversidade de constituintes em sua composição, como por exemplo, sais, ácidos, bases, gorduras e proteínas com propriedades químicas diferentes (XU *et al.*, 2016). É importante ressaltar que a qualidade nutricional dos alimentos está relacionada não só a concentração de minerais, mas também a concentração e ao tipo de proteínas presentes, tornando, então, necessário mais estudos envolvendo estas biomoléculas (COZZOLINO, 2005).

As proteínas (objeto de estudo deste trabalho) estão presentes nos organismos dos seres vivos nas mais variadas formas, se caracterizando como macromoléculas complexas com regiões polares, hidrofóbicas e carregadas que possuem funções como, catalisadoras, transportadoras, componentes estruturais de tecidos animais, dentre outras (FUJIMOTO *et al.*, 2002). A extração deste analito, geralmente, se torna uma tarefa complexa devido a dinâmica orgânica, biomolecular, extracelular, intracelular e química inerente dos seus consórcios ambientais (LEARY, 2013).

Diante disto, o maior desafio para os estudos em proteômica é a natureza intrinsecamente complexa dos proteomas (CANAS, *et al.*, 2007). Em vista desta complexidade, o preparo de amostra é uma etapa fundamental para obter sucesso em pesquisas proteômicas. A etapa de preparo da amostra visa a obtenção das espécies minimizando os interferentes.

A aplicação de planejamentos experimentais combinados com metodologia de superfície de resposta contribuem para melhorar a eficiência no preparo de amostra, por serem metodologias multivariadas que durante a otimização levam em consideração todas as variáveis e suas possíveis interações. Os empregos destas estratégias proporcionam a obtenção do máximo de informação com a redução do número de ensaios experimentais (WANI *et al.*, 2008), em menor tempo e consumo de reagentes (BARROS NETO; SCARMINO; BRUNS, 2010).

Trabalhos anteriores como os de Araújo *et al.*, (2014) e L'Hocine e Pitre (2016) otimizaram metodologias de extração de proteínas em amostras de rins, farinhas de amêndoa, avelã, amendoim e pistache utilizando planejamentos experimentais. No entanto, a maioria dos trabalhos descritos na literatura para extração de proteínas em carne caprina como os de Adeyemi *et al.*, (2015) e Guerra *et al.*, (2011) empregam métodos já estabelecidos que na maioria das vezes não preservam a estrutura das proteínas, como os descritos nos Associação de Métodos Oficiais dos Químicos Analíticos - AOAC (AOAC, 2000).

De acordo com o exposto, a literatura não reporta trabalhos utilizando planejamento experimental voltado para o estudo proteômico nesse tipo de matriz, sendo que, os estudos reportados que realizam a extração de proteínas da carne caprina empregam métodos propostos para outros tipos de matrizes, podendo estes seres insuficientes para a elucidação do proteômica desta carne.

Dentro desse contexto, nesta dissertação realizou-se um estudo empregando planejamento fatorial e a metodologia de superfície resposta para melhor compreender e otimizar os fatores que influenciam o processo de extração de proteínas da carne caprina, fornecendo um protocolo útil de preparo de amostras para posteriores estudos proteômicos envolvendo tal carne.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Otimizar um método de extração de proteínas da carne caprina utilizando planejamento fatorial e metodologia de superfície resposta com o intuito de desenvolver um protocolo para futuras análises.

3.2 Específicos

- ✓ Verificar o efeito das variáveis na extração das proteínas;
- ✓ Propor um modelo empírico para o método de extração;
- ✓ Validar o modelo estatístico;
- ✓ Quantificar o teor total de proteínas pelo método de Bradford;
- ✓ Investigar o efeito da temperatura nos ensaios de extração empregando HPLC-SEC-DAD;
- ✓ Obter um método não destrutivo para extração de proteínas;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carne caprina

A carne pode ser definida como o produto resultante as contínuas transformações que ocorrem no músculo após a morte do animal. É utilizada como alimento de elevada qualidade nutricional (MONTE *et al.*, 2012). As carnes se subdividem em brancas (frango e peixe) e vermelhas (ovina, suína, bovina e caprina). Levando em consideração as vermelhas, nestas estão incluídas principalmente a carne ovina, suína, bovina e caprina. Para o funcionamento e bem estar do organismo, a ingestão destas carnes é essencial, pois fornece energia, ajuda na formação de novos tecidos e regula os processos plasmáticos, fisiológicos e orgânicos.

Para a maioria dos consumidores de carne, gosto e valor nutricional são dois atributos de qualidade importantes para que as carnes sejam consumidas (WEBB; O'NEILL, 2008), dentre essas características a carne caprina se destaca das demais carnes vermelhas, pois apresenta sabor, suculência e maciez que distinguem a carne desta espécie (MADRUGA; BRESSAN, 2011). Além destas, esta carne apresenta propriedades nutricionais interessantes que apresentam um papel significativo na nutrição humana, como os aminoácidos essenciais, tais como, lisina, treonina, triptofano, baixos teores de gorduras e colesterol e elevado teor de minerais (IVANOVIC *et al.*, 2016).

Quando a carne caprina é comparada com a bovina, a mesma é similar em relação ao teor de proteínas, superior em níveis de ferro e possui um menor percentual de lipídios, sendo considerada pelos especialistas a carne mais magra e saudável dentre as vermelhas. Diante disto, a carne caprina apresenta grande potencial de consumo em razão de seu valor nutritivo e de sua aceitabilidade no mercado consumidor, sendo que a raça, idade e sexo são listados como fatores genéticos importantes que influenciam as qualidades físico-químicas e sensoriais dessa carne (MADRUGA *et al.*, 2002)

Em vista dessa grande importância nutricional e comercial que a carne caprina vem desempenhando mundialmente, torna-se importante que além da busca pelo crescimento produtivo seja realizada uma criteriosa avaliação da qualidade do seu produto final.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (IBGE, 2015) o rebanho de caprinos no Brasil chegou ca. 7 milhões de animais em 2006. Já no ano de 2015, a quantidade elevou-se para 10 milhões. Esses dados, revelam que houve um aumento de 30% na produção caprina do país. Este aumento pode ser relacionado ao fato que a população passou a tomar conhecimento das informações sobre as características nutricionais dessa carne.

A região Nordeste do Brasil se destaca como principal consumidor dessa carne e produtor com um rebanho estimado em cerca de 93% do total nacional. A razão para esta região do país apresentar maior rebanho está associada as suas características climato-geográficas, tais como, escassez de água, clima árido e um alto relevo. Sendo estas condições favoráveis para criação desses animais, considerados rústicos, ou seja, sua criação exige pouco manejo e são bastante resistentes para enfrentar as condições adversas do ambiente.

2.2 Proteínas

Proteínas são moléculas formadas de aminoácidos unidos por ligação peptídica, cujas funções quase invariavelmente dependem de interações com outras moléculas, e essas interações são influenciadas de maneira fisiologicamente importante por alterações algumas vezes sutis, outras drásticas, na conformação das proteínas (LEHNINGER, 2004). Por estas razões, estudos de proteínas são de suma importância pois podem descrever as condições do ambiente biológico, uma vez que estas moléculas são sensíveis a alterações que modifiquem o meio no qual estão inseridas.

As proteínas possuem papel fundamental nos processos biológicos. Praticamente todas as transformações moleculares que definem o metabolismo celular são mediadas por catálise protéica. As proteínas exercem também funções regulatórias, controlando as condições intracelulares e extracelulares e mandando informações para outros componentes da célula (VOET, 2014). Estas biomoléculas também fazem parte da composição de inúmeras formulações devido possuírem características de valores funcionais e nutricionais (O'SULLIVAN; O'MAHONY, 2016).

As proteínas em especial as alimentares, são moléculas complexas e versáteis, com diversas funções. A variação na funcionalidade está associada à sua estrutura. Portanto, o conhecimento da relação estrutura-função das proteínas alimentares é importante para entender o efeito dos fatores de transformação nos aspectos físico-químicos, sensoriais e nutricionais desses ingredientes alimentares de alto valor nutritivo (BRANDA; KULOZIK, 2017).

2.2.1 Propriedades funcionais

O termo funcional descreve qualquer outra propriedade que contribuem para os aspectos benéficos de um ingrediente dentro de uma formulação (DAMODARAN, 1997). As proteínas são moléculas altamente funcionais capazes de estabilizar o óleo, gotas e bolhas de ar, formações de estruturas de gel e o aumento da viscosidade (O'CONNELL; FLYNN, 2007; WALSTRA; VLIET, 2003) devido a característica química complexa destas moléculas, caracterizadas por suas sequências de aminoácidos únicas (BEVERUNG *et al.*, 1999).

As proteínas desempenham uma surpreendente variedade de funções essenciais dinâmicas e estruturais nos organismos dos mamíferos. Essas funções incluem: catálise de transformações químicas, as quais exigem uma enzima específica catalisadora para garantir que essas reações ocorram numa velocidade compatível com a vida; transporte, outra função importante das proteínas responsável pela chegada de nutrientes e saída de componentes tóxicos das células, além de carregamento de lipídios, metabólitos, hormônios esteroides, vitaminas, moléculas sinalizadoras e minerais; papel protetor, realizado por imunoglobulinas, proteínas do complemento e interferons impedindo ação bacteriana e viral; hormônios e proteínas que regulam transcrição e tradução gênica; estrutural proporcionando elasticidade e força aos órgãos e sistema vascular (DEVLIN; MICHELACCI, 2011).

O melhoramento das propriedades funcionais das proteínas vem sendo de grande interesse comercial, com o propósito de aumentar o valor comercial e sua utilização, o que é usualmente conseguido através da modificação do peso ou conjugação/complexação com outros biopolímeros (DRAPALA *et al.*, 2015; GRIGOROVICH *et al.*, 2012; KURUKJI *et al.*, 2015; MALAKI *et al.*, 2010; MULCAHY *et al.*, 2016; O'SULLIVAN *et al.*, 2016).

2.2.2 Propriedades nutricionais

As proteínas desempenham função energética participando do crescimento e desenvolvimento do organismo, pois quando ingeridas em altas quantidades, atuam no fornecimento de energia dos processos listados. O maior efeito termogênico das proteínas pode ser causado pelo aumento da síntese proteica e do consumo de ATP para a síntese das ligações peptídicas, bem como outros aspectos do aumento da síntese e degradação associada à maior ingestão deste macronutriente (GARLICK; MCNURLAN; BALLMER, 1991; GIODANO; CASTELLINO, 1997).

O valor proteico de um alimento é determinado não somente pela composição de aminoácidos essenciais, mas também pelo aproveitamento biológico deles, que depende da digestibilidade da proteína. A digestibilidade é a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo na forma de aminoácidos ou qualquer outro composto nitrogenado (ALVES; ROCHA; GOMES, 2008). Ela determina a qualidade proteica na dieta junto com o teor de nitrogênio e a medida de aminoácidos presentes em uma fonte de proteína e compara com valores de uma proteína tida como referência. Quando certas ligações peptídicas não são hidrolisadas na digestão, parte da proteína é excretada nas fezes ou transformada em produtos do metabolismo pelos microrganismos do intestino grosso (SGARBIERI, 1987).

Estudos mostram que as proteínas de origem animal não apresentam aminoácidos limitantes, levando essa classe de proteínas a característica de alto valor nutricional com capacidade de nutrir o organismo humano com níveis adequados de aminoácidos essenciais possivelmente devido à ausência de fatores antinutricionais. Durante a conformação da proteína, a sua estrutura influencia a sua hidrólise pelas proteases. Presença de fatores denominados antinutricionais, como exemplo, os alimentos de origem vegetal, podem ser inibidores das proteases ou compostos que se ligam aos resíduos de aminoácidos, impedindo a hidrólise completa da proteína. Nas ligações químicas, a interação das proteínas com polissacarídeos e fibras alimentares também reduz a sua taxa de absorção e a porcentagem da hidrólise e o processo de digestibilidade das proteínas pode ser alterado também quando alguns resíduos de aminoácidos são expostos a temperaturas elevadas e pH básico (BRESSANI, 1989; CASSIDY, 1996).

2.3 Preparo de amostra na extração de proteínas

O objetivo de um procedimento analítico é obter o máximo de informação a respeito do objeto de estudo. O preparo de amostra é a etapa prévia de qualquer análise. Na maioria dos casos, esta é a etapa mais crítica de todo processo analítico, onde os analistas gastam mais tempo afim de obter resultados mais adequados e confiáveis para o estudo proposto. O papel do preparo de amostra é realizar a limpeza “remoção de interferentes” de amostras complexas, além de deixar o analito a um nível de concentração adequado para sua determinação. Em síntese, esse procedimento visa a extração, o isolamento e a concentração dos analitos presentes nas matrizes. De maneira geral, o preparo da amostra é necessário antes das análises. Este procedimento pode ser simples, como a diluição ou pré-concentração de uma amostra aquosa, ou mais laborioso, no caso de amostras complexas.

A extração ou separação de um componente químico consiste num processo em que a fase extratora está normalmente em contato com a matriz da amostra e os analitos são transportados entre as fases. Nesse sentido, o conhecimento das propriedades químicas de um analito, bem como as propriedades da fase ou do ambiente químico em que o analito esteja presente é de extrema importância para o sucesso de qualquer extração (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015). O processo de extração envolvendo proteínas mostra-se como atividade complexa, uma vez que esse procedimento pode alterar as condições do ambiente biológico em que essas biomoléculas se encontram e com isso afetar a integridade dessas macromoléculas.

A extração das proteínas é um dos processos mais cruciais nos estudos de proteômica. A remoção dos interferentes é importante para um adequado procedimento de extração, pois elimina sais, ácidos, lipídios, proteínas majoritárias e materiais particulados. Os mesmos podem interagir com a proteína de interesse e diminuir ou aumentar o sinal desejado pelo analista (CANAS *et al.*, 2007).

Um pré-requisito para qualquer análise proteômica é que os métodos de extração capturem a maior variedade de proteínas, mas não extraia preferencialmente certos subconjuntos de proteínas abundantes, pois essas podem mascarar as proteínas de baixa abundância. É também preferível que os métodos forneçam extratos com uma quantidade mínima de interferentes para se produzir resultados fidedignos (SPEDA *et al.*, 2017). Destacando alguns dos principais métodos

empregados no estudo dessas biomoléculas como: a extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction, LLE*), extração em fase sólida (*Solid phase extraction, SPE*), filtração, entre outros.

A filtração é empregada na remoção do material particulado das amostras líquidas e na seleção de massa das biomoléculas a serem estudadas. A separação se dá por meio de força centrífuga ou membranas porosas submetidas a força do vácuo. A filtração por membrana em muitos casos não é suficiente para remover compostos potencialmente interferentes. O tratamento subsequente do filtrado utilizando extração em fase sólida ou outros meios de separação de analitos ou modificação de matriz é necessário sempre que a amostra contenha compostos de elevado peso molecular para serem analisados (FRENZEL; MARKEVICIUTE, 2017).

A extração líquido-líquido (LLE) é considerada simples e de elevada seletividade. Consiste na separação dos compostos baseada na diferença de solubilidade na fase aquosa ou orgânica, sendo sua eficiência dependente de uma seleção adequada do tipo de solvente, ajuste do pH, bem como um controle da força iônica do meio (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015). Esse sistema consiste em duas fases parcialmente solúveis, tendo como vantagens: operação rápida, fácil aplicação, altos rendimentos e boa seletividade.

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de separação que utiliza uma fase sólida para isolar um ou mais tipos de analito de uma solução. É comumente mais usada em amostras diversas como um passo de limpeza para remover proteínas de alta abundância (GARCIA; NEUBERT, 2007). A SPE possui vantagens como o menor volume de solvente, não forma emulsões e possui uma maior versatilidade nas análises.

Diante do exposto, percebe-se que existe uma vasta variedade de técnicas para análises de proteínas. Mesmo assim, estudar estas biomoléculas não é uma tarefa fácil, uma vez que as estratégias de preparo de amostra para a análise de proteínas devem ser cuidadosamente selecionadas, para que os resultados obtidos em estudos proteômicos sejam fidedignos e reprodutíveis.

2.4 Quimiometria

Na década de 70, surgiram os primeiros trabalhos sobre a Quimiometria, área que resulta da união entre química e estatística. A partir da década de 90, com a disseminação dos computadores, a quimiometria passou a ser disseminada nos laboratórios de pesquisa e na indústria, ganhando maior destaque nas mais diferentes áreas da química (PEREIRA *et al.*, 2014). A quimiometria pode ser definida como uma área da química que se refere à aplicação de métodos estatísticos e matemáticos para identificação de informações relevantes de um problema de origem química.

A química analítica é uma das áreas da química que mais se beneficia com a quimiometria, pois com o aumento das alterações nos números de parâmetros e a sofisticação da instrumentação química tem a sua disposição uma grande quantidade de dados. Estes dados podem ser melhor analisados e interpretados com a utilização de técnicas quimiométricas.

Segundo Perreira Filho (2015) as técnicas quimiométricas mais aplicadas para resolução de problemas relacionados com a Química, estão listadas abaixo:

- Análise exploratória de dados químicos (PCA, Principal Component Analysis) e (HCA, Hierarchical Cluster Analysis);
- Calibração multivariada (PCR, Principal Component Regression) e (PLS, Partial Least Squares);
- Proposição de modelos de classificação (SIMCA, Soft Independent Modelling of Class Analogy) e (PLS-DA, PLS for Discriminant Analysis);
- Emprego de planejamentos fatoriais combinado com a metodologia de superfície resposta (Planejamentos fracionários), (Planeamentos completos), (Composto central) e (Box-Behnken);

Na realização da presente dissertação foram utilizadas técnicas de otimização como o planejamento experimental e metodologia de superfície resposta. Na próxima seção serão apresentadas algumas características sobre a técnica de planejamento fatorial, apresentando conceitos, vantagens, limitações e aplicações.

2.4.1 Notações

Tendo em vista o padrão matemático usado em textos de quimiometria, neste trabalho, utilizam-se as seguintes notações: escalares são definidos em itálico (por exemplo, *n*); vetores como letras minúsculas em negrito (por exemplo, **y**) e matrizes como letras maiúsculas em negrito (por exemplo, **X**); os sobrescritos T e -1 representam as operações transposta e inversa, respectivamente.

2.4.2 Planejamento fatorial

Nos últimos anos, a otimização de métodos analíticos tem passado por mudanças perceptíveis. A utilização de técnicas multivariadas vem se difundindo e demonstrando sua utilidade em diversos campos do conhecimento, merecendo destaque os estudos envolvendo processos biotecnológicos, processos químicos, sínteses orgânicas e otimização de processos industriais (ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005). Uma alternativa é o uso do planejamento fatorial, que é um dos processos estatísticos disponíveis para otimização multivariada, sendo amplamente aplicado em química devido à sua utilidade na identificação das variáveis mais significativas de um determinado sistema analítico (ATRACHE *et al.*, 2013).

Empregando planejamento fatorial baseado em princípios estatísticos, os pesquisadores podem extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos, reduzindo uso de reagentes, o tempo, entre outras vantagens (BARROS NETO; SCARMINO; BRUNS, 2010). Esta ferramenta pode ser considerada como um recurso de grande valia, quando se deseja estudar os efeitos de duas ou mais variáveis sobre a eficiência de um processo, investigando-se os efeitos das combinações possíveis dos níveis de cada variável selecionada do sistema.

Em geral a utilização desse método multivariado pode proporcionar diversas vantagens tais como: interações entre as variáveis podem ser identificadas, modelos de regressão permitem construir uma superfície de resposta, obtenção da condição ótima de análise, redução de tempo e custo das análises (BREITKREITZ; SOUZA; POPPI, 2014). Já a técnica univariada, na qual se varia uma única variável por vez até chegar em um ponto ótimo através do método de tentativa e erro. Esta, além de

consumir maior quantidade de recursos, também negligência as interações entre as variáveis.

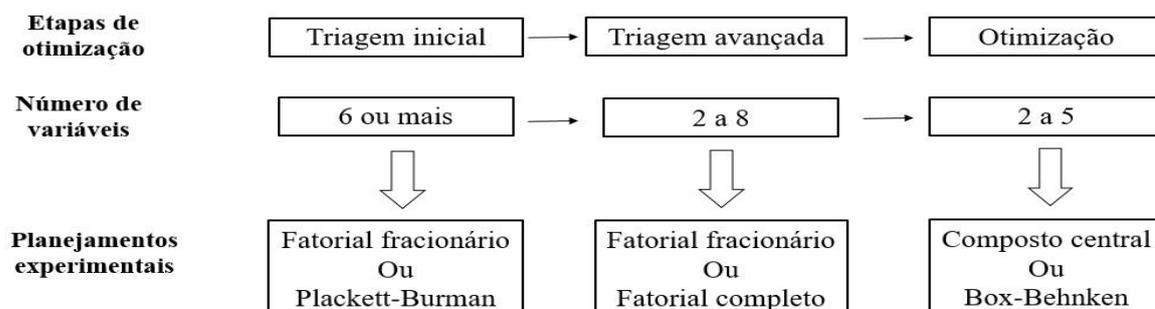
A utilização de planejamentos na execução dos experimentos pode gerar um maior número de informações, sendo que o sucesso destas informações consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que o analista busca. Para tanto, é necessário previamente que analista defina os objetivos, conheça todo domínio experimental em torno da resposta desejada.

Para se executar um planejamento fatorial é necessário conhecer algumas terminologias importantes (HIBBERT, 2012):

- Fatores ou variáveis – são características que podem ser variadas dentro de um sistema e que afetam a resposta como, por exemplo: temperatura, tempo, concentração de reagentes, força iônica, pH, tipo de catalizador, etc.
- Níveis – é a faixa ou grau de variação de um fator/variável. Exemplos: temperatura de 25-50°C, tempo de 20-40 minutos, pH de 7-9, etc.
- Resposta ou variável dependente – quantidade medida ou observada, que é o objeto de estudo da otimização.
- Modelo – equação que relaciona a resposta aos fatores.
- Superfície de resposta – relação de uma resposta aos valores de um ou mais fatores, é um gráfico de uma ou duas dimensões da função que é ajustada aos dados experimentais.

Para cada uma das diferentes situações que o analista se depara, existem muitos tipos de planejamentos que podem ser empregados de acordo com a finalidade que se deseja (Figura 1).

Figura 1 – Esquema do processo de otimização através de planejamentos fatoriais



Fonte – Do próprio autor (2017)

Na Figura 1 os modelos de planejamento de triagem (modelos lineares) permitem avaliar os efeitos das variáveis principais e suas interações. Já os modelos de otimização (modelos quadráticos) permitem avaliar com mais detalhe tendo como objetivo otimizar simultaneamente os níveis das variáveis para obter máximos ou os mínimos, ou seja, o melhor desempenho do sistema (BEZERRA *et al.*, 2008). No que tange o desenvolvimento desta dissertação, foram utilizados o planejamento fatorial completo e o composto central.

Neste contexto partiremos para um exemplo de como calcular os efeitos e determinar a significância das variáveis e suas interações utilizando um planejamento fatorial 2^2 (dados criados pelo próprio autor), onde vamos estudar o efeito da temperatura nos níveis – (25°C) e + (40°C), volume do extrator – (5 mL) e + (10 mL) sobre o teor de proteína extraída. O planejamento experimental está na Tabela 1 já com as combinações possíveis e seus resultados.

Tabela 1 - Resultados do planejamento fatorial 2^2

Ensaio	Temperatura (°C)	Volume do extrator	Teor de proteína (mg g ⁻¹)		Média	Variância
1	25	10	128	133	130	12,5
2	40	10	164	160	162	8
3	25	20	127	124	125,5	4,5
4	40	20	138	141	139,5	4,5

Diante destes resultados pode-se montar a matriz de planejamento P e em seguida transpor esta matriz P^T , por fim multiplicar pelo vetor (y) que corresponde as respostas obtidas (Equação 1).

$$\mathbf{P} \begin{bmatrix} M & T & V & TV \\ +1 & -1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & +1 & +1 \\ +1 & -1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & +1 & +1 \end{bmatrix} \cdot \mathbf{y} \begin{bmatrix} 128 \\ 164 \\ 127 \\ 138 \\ 133 \\ 160 \\ 124 \\ 141 \end{bmatrix} = \mathbf{e}$$

Transpondo a matriz P

{Equação 1}

$$\mathbf{P}^T \begin{bmatrix} +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 \\ -1 & +1 & -1 & +1 & -1 & +1 & -1 & +1 \\ -1 & -1 & +1 & +1 & -1 & -1 & +1 & +1 \\ +1 & -1 & -1 & +1 & +1 & -1 & -1 & +1 \end{bmatrix} \cdot \mathbf{y} \begin{bmatrix} 128 \\ 164 \\ 127 \\ 138 \\ 133 \\ 160 \\ 124 \\ 141 \end{bmatrix} = \mathbf{e} \begin{bmatrix} M \\ T \\ V \\ TV \end{bmatrix}$$

A matriz dos efeitos obtida (E) tem que ser corrigida dividindo a média global (M) por 8 e os efeitos primários e secundários por 4. Após isto os efeitos das variáveis são obtidos sendo: temperatura (T) = 22,75, volume do extrator (V) = -13,75 e a interação temperatura *versus* volume do extrator (TV) = -8,75.

As significâncias estatísticas dos efeitos calculados ao nível de confiança de 95% pode ser calculada obtendo a variância combinada (s^2) de acordo com a Equação 2, onde v_i e s_i^2 são o número de graus de liberdade e a variância obtida em cada ensaio, respectivamente, do i -ésimo ensaio (BARROS NETO; SCARMINO; BRUNS, 2010).

$$s^2 = \frac{v_1 s_1^2 + v_2 s_2^2 + \dots + v_i s_i^2}{v_1 + v_2 + \dots + v_i} \quad \{\text{Equação 2}\}$$

$$\hat{V} = \left(\left(\left(\frac{1}{8^2} \right) + \left(\frac{1}{8^2} \right) \dots + \left(\frac{1}{8^2} \right) \right) s^2 \right) / 2 \quad \{\text{Equação 3}\}$$

A variância do efeito (\hat{V}) é calculada de acordo com a Equação 3 acima, considerando que s^2 é uma boa estimativa da variância de uma observação (neste

caso, uma estimativa com 4 graus de liberdade). O erro do efeito (S_{efeito}) é calculado pela raiz quadrada da variância do efeito. A partir desses resultados podemos substituir o erro do efeito na Equação 4, em que $\hat{\eta}$ será a estimativa do efeito calculado a partir dos experimentos para cada variável ou interação e t_v é o valor de t de student (2,776) para 4 graus de liberdade. Para que o efeito verdadeiro (η) seja significativo, o intervalo de confiança obtido com resultado da Equação 4 não deverá incluir o zero.

$$\hat{\eta} - t_v \times S_{efeito} \leq \eta \leq \hat{\eta} + t_v \times S_{efeito} \quad \{\text{Equação 4}\}$$

Resolvendo as equações acima, a variância combinada é igual a 7,375, variância de um efeito é de 3,687 e o erro do efeito é igual a 1,92. Com esses resultados, utilizando a Equação 4 observa-se que todos os efeitos da temperatura e volume do extrator não incluem o zero no seu intervalo, portanto as variáveis temperatura [17,24;28,08], tempo de extração [-19,08;-8,42] e a interação temperatura e tempo de extração [-14,08;-3,42] são significativos ao nível de confiança de 95%, pois incluem o zero no seu intervalo de confiança.

2.4.3 Metodologia de superfície resposta

Nesta subseção pretende-se expor breves comentários a respeito da metodologia de superfície de resposta (Response Surface Methodology – RSM). A Metodologia de Superfície de Resposta foi desenvolvida por George Box com a colaboração de outros pesquisadores, na década de 50 (GILMOUR, 2006). A RSM pode ser definida como o conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas úteis para o desenvolvimento, aperfeiçoamento e otimização de processos em que uma resposta de interesse é influenciada por várias variáveis, sendo seu objetivo otimizar essa resposta (BAS; BOYACI, 2007).

A RMS é uma técnica baseada em planejamentos fatoriais que utiliza duas etapas para a otimização de experimentos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010), modelagem e deslocamento, sendo realizadas tantas vezes quanto forem necessárias até atingir a região ótima da superfície investigada.

Na modelagem é proposto um conjunto de experimentos (planejamento fatorial) que podem se ajustar ou não de acordo com as respostas adquiridas. Já no deslocamento, “caminha-se” para a região que o analista deseja “máxima ou mínima” de um determinado modelo. As modelagens dos modelos são descritas por funções polinomiais lineares ou quadráticas as quais fornecem condições de explorar o sistema até alcançar a sua otimização (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

A construção da superfície de resposta ocorre com a obtenção dos coeficientes do modelo. Para o cálculo dos coeficientes (b_i) emprega-se a resolução por mínimos quadrados (Equação 5):

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y} \quad \{\text{Equação 5}\}$$

onde \mathbf{b} é o vetor com coeficientes (b_i), \mathbf{X} é a matriz experimental com os parâmetros normalizados e \mathbf{y} é um vetor contendo as respostas experimentais obtidas.

Para planejamentos experimentais envolvendo dois níveis, que são aqueles que a resposta varia linearmente “modelo linear de interação”, podem ser definidos de acordo com a Equação 6:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + \dots + b_j x_1 x_2 \quad \{\text{Equação 6}\}$$

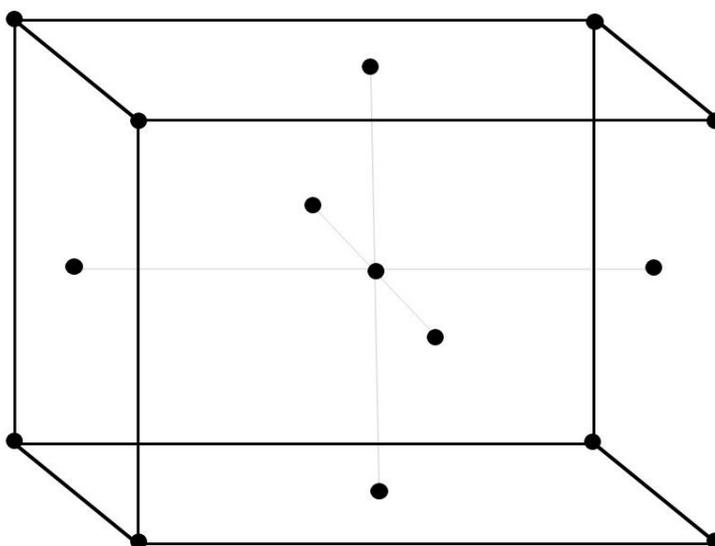
sendo y a variável dependente, b_0 é o termo constante, b_1, b_2, \dots, b_j são os coeficientes da regressão, x_1, x_2, \dots, x_j são as variáveis independentes.

Se a resposta não for bem modelada por uma função linear ou de interação das variáveis independentes, então uma aproximação polinomial quadrática deverá ser empregada. Para se determinar um ponto crítico “máximo ou mínimo”, é necessário que a função polinomial contenha termos quadráticos que podem ser gerados aplicando pontos axiais no domínio experimental. Podemos destacar dois modelos com termos quadráticos mais utilizados para otimização de processos: planejamento composto central com pontos estrelas que varia em cinco níveis diferentes e o planejamento de face centrada que varia em três níveis diferentes.

Nesta dissertação utilizou-se o planejamento composto central de face centrada com três variáveis que pode ser mais bem entendido através da Figura 2. O

nome "Face Centrada" deriva do fato de que a localização dos pontos estrelas corresponde ao centro de cada face do cubo.

Figura 2 – Modelo cúbico de face centrada



Fonte: Do próprio autor (2017)

A função que descreve um modelo quadrático pode ser representada pela Equação 7:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 \dots b_jx_1x_2 \quad \{\text{Equação 7}\}$$

onde os termos $b_{11}x_1^2$ e $b_{22}x_2^2$ representam os termos quadráticos do modelo. Os dois modelos descritos nas Equações 6 e 7 são denominados empíricos e são utilizados para construir uma superfície resposta de uma determinada região.

Para otimização do processo analisado, ou seja, para encontrar o ponto mínimo ou máximo da superfície, deve se utilizar ferramentas de cálculo diferencial, encontrando-se as derivadas parciais da equação do modelo quadrático e igualando-as a zero, obtendo-se assim os pontos críticos.

2.5 Cromatografia de exclusão por tamanho

Cromatografia pode ser definida como uma técnica analítica utilizada na separação, identificação e quantificação de componentes químicos presentes em misturas (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). Esta técnica de separação possui uma versatilidade de mecanismos de separação. Quando combinadas as diferentes fases móveis e estacionárias a separação dos componentes presentes em uma mistura se dá pela diferença do comportamento dos analitos entre a fase móvel e a fase estacionária.

Dentro da cromatografia líquida existem diferentes modalidades que podem ser empregadas na separação, tais como, por exclusão, troca iônica, fase reversa, interação hidrofóbica, bioafinidade e interação hidrofílica. A modalidade cromatográfica a ser empregada vai depender da natureza do analito de interesse, podendo levar em consideração a polaridade, solubilidade, massa molecular, relação antígeno/anticorpo (MICHALKE, 2002).

Destacando os três modos mais comuns de cromatografia empregados na análise de proteínas temos: exclusão por tamanho, que separa proteínas com base no seu tamanho, cromatografia de troca iônica, capaz de separar proteínas com base na sua carga e cromatografia em fase reversa, em que a separação ocorre com base na hidrofobicidade das proteínas (FEKETE; GUILLARME, 2014).

No tocante a cromatografia de exclusão por tamanho (SEC, *Size Exclusion Chromatography*), também denominada de filtração em gel, permeação em gel e cromatografia em peneira molecular de difusão restrita, a ordem de eluição das moléculas é definida por pelo tamanho, sendo que as moléculas maiores apresentam os menores volumes de eluição. Esta técnica é utilizada na caracterização de polímeros, proteínas e no controle de qualidade (HONG; KOZA; BOUVIER, 2012; FEKETE *et al.*, 2014).

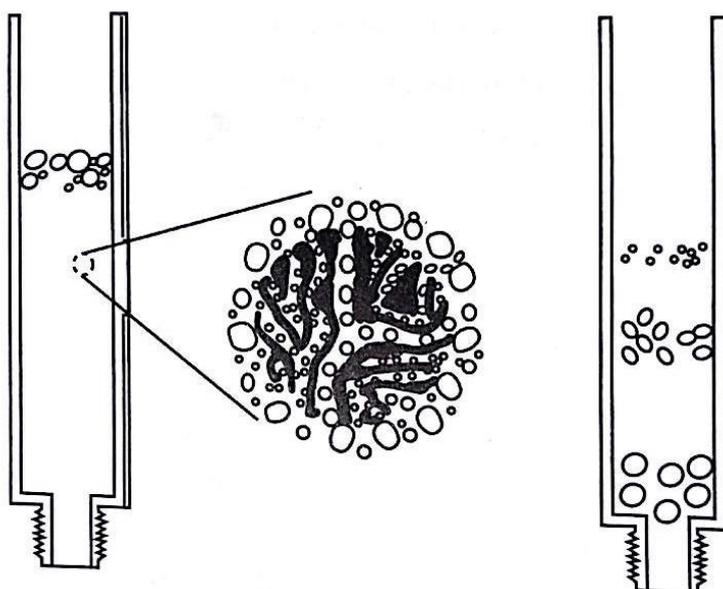
Segundo Schure e Moran (2017), as características de desempenho da SEC não estão na escala das eficiências típicas das colunas usadas para separações em fase reversa ou fase normal. No entanto, a SEC continua a ser altamente utilizada para separações, pois apresenta propriedades desejáveis, tais como: o fracionamento pode ser realizado com base no tamanho molecular, a escolha da temperatura e fase móvel não é tão crítica por não depender especificamente de interações químicas entre a coluna e o soluto para separação, a massa molecular de um composto pode

ser estimada. Esta modalidade cromatográfica promove a separação das proteínas de maneira suave, de modo a preservar a estrutura conformacional e as interações intermoleculares presentes nas moléculas (FEKETE; GUILLARME, 2014).

A fase estacionária da SEC é constituída de um recheio ou gel de macromoléculas que têm ligações cruzadas, com afinidade pelos solventes mais que neles são insolúveis. Essa fase emprega partículas rígidas e pequenas com base de sílica ou poliméricas, de tamanhos de poros bem controlados para se separar moléculas de distintos tamanhos (LANÇAS, 2009). A estrutura tridimensional e estabilidade mecânica é dada por diferentes materiais. Alguns exemplos destes materiais que constituem a fase estacionária da SEC são: géis de dextrana, géis de poliácridamida, géis de ágar e agarose. Esses géis precisam ter algumas características tais como a inércia química, estabilidade a condições brandas de pH e temperatura e possuir baixo teor de íons.

A separação das proteínas na SEC se dá com base na sua diferença no volume hidrodinâmico na fase móvel, pela difusão para dentro e para fora dos poros estagnados (GOYON; GUILLARME; FEKETE, 2017), ou seja, a separação dos componentes presentes na amostra faz-se através de peneiras moleculares, baseando-se em seus tamanhos e conformações geométricas (Figura 3).

Figura 3 – Princípio da cromatografia de exclusão por tamanho



Fonte: Collins; Braga; Bonato (2006)

Collins, Braga e Bonato (2006) descrevem que as moléculas pequenas penetram pelo interior dos poros do gel e permeiam para a base da coluna até serem retiradas da coluna em tempos distintos, enquanto as moléculas maiores, não conseguindo penetrar no interior dos poros, contornam as partículas do gel e seguem mais rapidamente para a base da coluna, eluindo antes das moléculas menores.

A principal aplicação da SEC está voltada para o estudo dos agregados de proteínas, trabalhos relatados na literatura como o de Saremirad *et al.*, (2014) empregam a cromatografia de exclusão por tamanho no estudo de proteínas oxidativas. Goyon *et al.*, (2016) utilizaram essa técnica para a análises de proteínas biofarmacêuticas. Neste contexto a cromatografia de exclusão por tamanho é uma ferramenta importante para o estudo dessas macromoléculas, na qual pode separar e estimar a massa molecular das mesmas.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e solventes

Todas as vidrarias utilizadas para a realização desta dissertação foram descontaminadas em banho de HNO₃ 10% (v/v) por no mínimo 24h. As soluções foram preparadas em água ultrapura com resistividade $\geq 18,2$ M Ω .cm.

Os seguintes reagentes e solventes foram empregados durante o desenvolvimento deste trabalho:

- ✓ Água ultrapura
- ✓ Etanol 95% (Vetec[®], Brasil)
- ✓ Éter de petróleo (Isotar[®], Brasil)
- ✓ Tris(hidroximetil)aminometano grau HPLC (J. T. Baker[®], Brasil)
- ✓ Coomassie brilliant blue g-250 (Sigma-Aldrich[®], Brasil)
- ✓ Ácido fosfórico 85% PA (Vetec[®], Brasil)
- ✓ Ácido clorídrico 37% (Merk[®], Brasil)
- ✓ Fosfato de amônio dibásico (Sigma-Aldrich[®], Brasil)

Para a calibração do espectrofotômetro e da coluna cromatográfica empregou-se os padrões abaixo:

- ✓ Albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich[®], Brasil)
- ✓ Blue dextran (GE Healthcare Bio-Science AB, Suécia)
- ✓ Tiroglobulina (GE Healthcare Bio-Science AB, Suécia)
- ✓ Ferritina (GE Healthcare Bio-Science AB, Suécia)
- ✓ Aldolase (GE Healthcare Bio-Science AB, Suécia)
- ✓ Conalbumina (GE Healthcare Bio-Science AB, Suécia)
- ✓ Cianalbumina (GE Healthcare Bio-Science AB, Suécia)

4.2 Equipamentos

- ✓ Agitador magnético (IKA[®], RH basic 1, Brasil)
- ✓ Agitador vortex (QUIMIS[®], Brasil)

- ✓ Estufa (Marconi[®], MA033/100, Brasil)
- ✓ Espectrofotômetro de absorção molecular UV-VIS (Femto[®], 600 plus, Brasil)
- ✓ Ultrasson (Soni-tech[®], Brasil)
- ✓ Banho maria Dubnoff (QUIMIS[®], Brasil)
- ✓ Centrífuga refrigerada (Hermle[®], z216K, Brasil)
- ✓ Liofilizador (LIOTOP[®], L101, Brasil)
- ✓ Moinho criogênico (Marconi[®], MA 775, Brasil)
- ✓ Balança analítica (Denver Instrument APX – 200, Brasil)
- ✓ Bomba de vácuo (Primatec[®], Brasil)
- ✓ pHmetro (MS Tecnopon Instrumentação[®], Brasil)
- ✓ Sistema de purificação Milli-Q (Millipore[®], Brasil)
- ✓ Cromatógrafo líquido (Agilent Technologies[®], Series 1260 infinity, Germany)

4.3 Materiais

- ✓ Coluna cromatográfica superdex[™] 200 10/300 GL (GE Healthcare Bio-Science AB, Suécia)
- ✓ Papel de filtro qualitativo 12,5 cm
- ✓ Papel alumínio
- ✓ Barra magnética
- ✓ Cubeta de plástico com caminho óptico de 1 cm
- ✓ Filtros para seringa com membrana PTFE de 0,22 µm
- ✓ Seringas de 15 mL
- ✓ Sistema de filtração a vácuo

4.4 Amostragem e preparo da amostra

Para a otimização do método de extração, as amostras de carne foram adquiridas, imediatamente, após o abate dos animais em um ponto de venda localizado no Mercado Central São José, mais conhecido como Mercado Velho de

Teresina, situado na rua Lisandro Nogueira, região centro-sul da cidade de Teresina-Piauí.

O corte escolhido foi o pernil, por ser o de maior preferência popular, sendo essa peça dividida em cubos de aproximadamente 3 cm³ e em seguida congelada em nitrogênio líquido por 15 minutos para a liofilização durante 48 h. Após esta etapa de secagem, a amostra foi submetida a moagem em moinho criogênico. O programa empregado para a moagem apresenta as seguintes condições: frequência de 16 Hz, durante 10 minutos intercalados entre congelamento com duração de 2 minutos e moagem em 1 minuto.

4.5 Método de extração das proteínas de carne caprina

Para as extrações das proteínas, 500 mg da carne caprina foi submetida a maceração constante utilizando almofariz e pistilo na presença da solução tampão extratora de Tris-HCl pH 7,3 em um banho termostático. As condições de extração como temperatura, concentração e volume de solução tampão estão definidas pelo planejamento experimental (Tabela 2). Em seguida, os extratos obtidos foram submetidos a centrifugação em uma centrífuga refrigerada por 10 min a 10000 rpm a 4°C.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e misturado na proporção 1:1 (v/v) com éter de petróleo. A mistura foi submetida a agitação magnética durante 10 min e centrifugada por 5 min a 10000 rpm a 4°C, após a centrifugação descartava-se a fase etérea. Esta etapa que visa a remoção dos lipídios foi repetida três vezes. Os extratos proteicos obtidos de carne caprina foram armazenados em tubos Falcon® a -20°C para posteriores análises.

4.6 Planejamento fatorial

Para a otimização da extração das proteínas presentes na carne caprina, inicialmente foi utilizado um planejamento fatorial completo do tipo 2⁴ como fase de triagem das variáveis. Os selecionados para análise foram: tempo de extração, concentração do extrator, temperatura de extração e volume do extrator (Tabela 2).

Tabela 2 - Variáveis e níveis do planejamento fatorial completo 2^4

Variáveis	Símbolos	Níveis e código das variáveis	
		-1	+1
Tempo de extração (min)	x_1	10	20
Concentração do extrator (mol L^{-1})	x_2	0,05	0,1
Temperatura de extração ($^{\circ}\text{C}$)	x_3	25	40
Volume do extrator (mL)	x_4	5,00	10,00

Ao todo foram realizados 16 ensaios em duplicata, sendo que os mesmos foram executados em ordem aleatória e dias diferentes para evitar erros sistemáticos. O teor total de proteínas (resposta monitorada) foi obtido pelo método de Bradford (1976), empregando a albumina como padrão.

Após a triagem das variáveis através do planejamento completo 2^4 para a extração das proteínas, partiu-se para um novo planejamento 2^3 com pontos centrais a fim de se obter um modelo empírico que explicasse os dados e permitisse maximizar a extração de proteínas. Nesse novo domínio experimental foram inseridas as variáveis que se mostram significativas e novos pontos em volta dos níveis que apresentavam uma maior eficiência na extração das proteínas (Tabela 3). A validação do modelo empírico gerado foi realizada através de análises de variância (ANOVA), gráfico de resíduos e valores previstos versus experimentais.

Tabela 3 - Variáveis e níveis do planejamento fatorial 2^3 com ponto central

Variáveis	Símbolos	Níveis e código das variáveis		
		-1	0	+1
Tempo de extração (min)	x_1	8	10	12
Temperatura de extração ($^{\circ}\text{C}$)	x_3	30	40	50
Volume do extrator (mL)	x_4	3,0	4,0	5,0

O planejamento fatorial 2^3 com ponto central foi realizado com oito experimentos autênticos e três réplicas no ponto central. O mesmo não foi suficiente para descrever os dados, sendo necessário a inserção de mais seis experimentos para o conjunto de dados se transformar em um modelo quadrático de face centrada.

4.7 Determinação do teor total de proteínas

Após a realização dos protocolos de extração, a concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). No preparo de 250 mL do reagente de Bradford para a quantificação espectrofotométrica das proteínas, utilizou-se 25 mg de coomassie brilliant blue g-250, 12,5 mL de etanol e 25 mL de ácido fosfórico 85 % PA. Completa-se para o volume final com água ultrapura. A solução foi agitada em agitador magnético durante 30 minutos, sendo filtrada em papel filtro qualitativo e armazenada em frasco protegido da luz. O preparo desta solução foi realizado ao abrigo da luz.

A quantificação das proteínas por espectrofotometria de absorção molecular deu-se retirando uma alíquota de 200 μL da amostra ou padrão, adicionou-se 2500 μL do reagente de Bradford ambos em uma cubeta. O tempo de reação antes da leitura realizada no comprimento de onda de 595 nm foi de 4 minutos.

Usando o padrão de albumina sérica bovina para a calibração do espectrofotômetro, foi preparado uma solução estoque de 1000 mg L^{-1} dissolvendo 10 mg de albumina em 10 mL de tampão fosfato (pH 7,2 a 0,1 mol L^{-1}), esta solução foi agitada em vortex por aproximadamente 1 min. As concentrações dos padrões da curva analítica foram de 25, 50 75, e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.8 Análises cromatográficas

Diante do aumento da temperatura nos ensaios realizados na extração das proteínas decidiu-se avaliar a influência da temperatura no perfil proteico dos extratos obtidos nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C. Para tanto, os extratos obtidos nas diferentes condições de temperatura foram submetidos a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo empregado um sistema cromatográfico (1260, Agilent, EUA) equipado com bomba quaternária, desgaseificador, auto amostrador, coletor de frações e detector do tipo DAD (*Diode Array Detector*).

As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna de exclusão por tamanho com faixa de 10 – 600 kDa, Superdex™ 200 10/300 GL. Para a calibração da coluna foram empregados padrões de diferentes massas molares: blue dextran

(2000 kDa); tiroglobulina (669 kDa); ferritina (440 kDa); aldolase (158 kDa) e conalbumina (75 kDa). As condições cromatográficas utilizadas para a realização das análises e calibração da coluna estão descritas na Tabela 4.

Cada amostra ou padrão injetado foi diluído na fase móvel e filtrada em filtros de seringa com membrana PTFE de 22 μm . Todas as amostras foram injetadas com concentração aproximadas em 15 mg mL⁻¹ para a comparação dos seus perfis.

Tabela 4 - Condições cromatográficas empregadas na análise de proteínas

Fase móvel	Tris-HCl 0,05 mol L ⁻¹ , pH 7,3
Fluxo	0,5 mL min ⁻¹
Tempo de corrida	55 min
Volume de injeção	40 μL
Comprimento de onda	280 nm

4.9 Análises dos dados

A análises dos dados obtidos e cálculos matemáticos dos modelos gerados foram realizados nos softwares Excel, Origin 8.0 e MATLAB R14b.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Planejamento fatorial 2⁴

Na escolha do domínio experimental a ser otimizado fez-se um estudo prévio na literatura, onde a mesma relata que a extractabilidade das proteínas é influenciada principalmente pelos fatores: pH da solução, tipo de extrator, temperatura de extração, tempo de extração, força iônica e volume do extrator (WALCZYK *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2015; PHONGTHAI; LIM; RAWDKUEN, 2016; DURMUS; EVRANUZ, 2010; MA; WANG; WU, 2010). Diante das variáveis mais reportadas na literatura, este trabalho escolheu os fatores que poderiam proporcionar um método de extração de menor custo, com baixa geração de resíduos e mais acessível para indústria e comunidade científica. Portanto, investigou-se os fatores: tempo de extração, volume do extrator, temperatura de extração e concentração do extrator nos níveis apresentados na Tabela 2.

O agente extrator utilizado foi o cloridrato de trihidroxiaminometano (Tris/HCl) que tem sido amplamente utilizado em diversos trabalhos (TRAN *et al.*, 2010; RESTELLI *et al.*, 2014; YALÇINKAYA *et al.*, 2016). O pH foi mantido em 7,3, uma vez que neste há a quebra das pontes de metileno, levando as proteínas a uma maior disponibilidade para dissolução no agente extrator (L. GUIST; A. LUCACCHUNI, 2013) o que corrobora com trabalhos anteriores de Rigueira *et al.*, (2016) que realizaram extrações de proteínas com Tris/HCl em sementes de aveia, trigo e soja visando identificar as proteínas e os metais ligados a elas e Danielsen, Pedersen e Bendixen (2011) que utilizou Tris/HCl para extração de proteínas do colostro em tecido intestinal de suínos.

Após as escolhas iniciais do tipo de extrator e pH do mesmo, o processo de otimização da extração das proteínas presentes na carne caprina se deu visando a máxima extração das proteínas. Em todos os ensaios realizados foram determinadas a concentração de proteína extraída pelo método de Bradford (1976).

A Tabela 5 apresenta a matriz de planejamento com as determinações do teor de proteína, em duplicata, para cada ensaio. Adicionalmente são reportados as respectivas médias e variâncias. Com as variáveis e seus respectivos níveis estudados foi obtido uma média de 162,23 mg g⁻¹ de proteína para os 16 experimentos

realizados em duplicata. Os efeitos dos fatores foram calculados para a realização de uma triagem das variáveis que exercem uma influência mais pronunciada no teor de proteína extraída.

Tabela 5 - Planejamento fatorial completo 2^4 para extração de proteínas (teor de proteína em mg g^{-1})

Ensaio	Variáveis Codificadas				Teor de Proteína			
	x_1	x_2	x_3	x_4	Rep 1	Rep 2	Média	Variância
E1	-1	-1	-1	-1	146,91	169,93	158,42	264,96
E2	+1	-1	-1	-1	165,01	176,50	170,76	66,01
E3	-1	+1	-1	-1	129,78	138,12	133,95	34,78
E4	+1	+1	-1	-1	152,33	166,57	159,45	101,39
E5	-1	-1	+1	-1	180,90	203,92	192,41	264,96
E6	+1	-1	+1	-1	190,99	187,14	189,07	7,41
E7	-1	+1	+1	-1	175,48	188,51	182,00	84,89
E8	+1	+1	+1	-1	195,14	187,96	191,55	25,78
E9	-1	-1	-1	+1	138,36	177,99	158,18	785,27
E10	+1	-1	-1	+1	143,77	148,29	146,03	10,22
E11	-1	+1	-1	+1	140,18	167,65	153,92	377,30
E12	+1	+1	-1	+1	153,30	152,47	152,89	0,34
E13	-1	-1	+1	+1	177,95	184,81	181,38	23,53
E14	+1	-1	+1	+1	141,75	125,83	133,79	126,72
E15	-1	+1	+1	+1	164,48	197,66	181,07	550,46
E16	+1	+1	+1	+1	117,31	104,57	110,94	81,15

Os efeitos principais (Tabela 6) das variáveis x_1 , x_2 , x_3 , x_4 e suas interações secundárias, terciárias e quaternária, por exemplo: x_1x_2 (secundária); $x_1x_2x_3$ (terciária); e $x_1x_2x_3x_4$ (quaternária) foram calculados de acordo com Barros Neto, Scarmino e Bruns (2010). Dentre todos os efeitos principais calculados podemos destacar os mais pronunciados como o do tempo de extração (x_1), temperatura de extração (x_3) e volume do extrator (x_4), já para os efeitos secundários temos a interação entre tempo de extração e volume do extrator (x_1x_4), temperatura de extração e volume do extrator (x_3x_4) e tempo de extração e temperatura de extração (x_1x_3).

Tabela 6 - Efeitos calculados

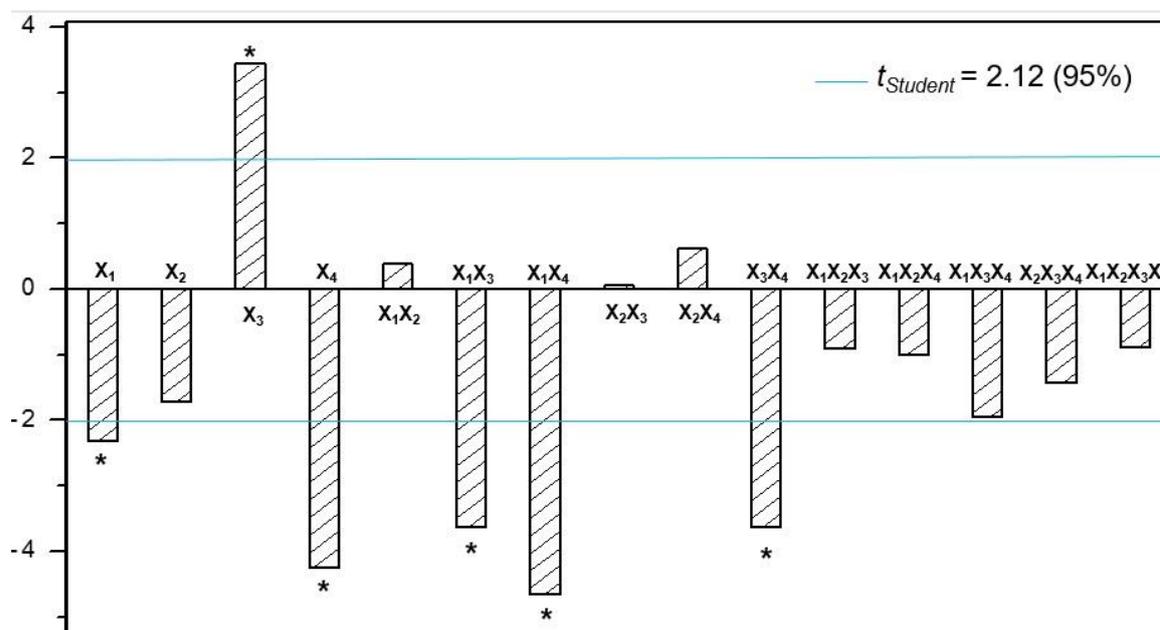
X_1	X_2	X_3	X_4	X_1X_2	X_1X_3	X_1X_4	X_2X_3
-10,855	-8,032	16,078	-19,924	1,832	-17,023	-21,865	0,263
X_2X_4	X_3X_4	$X_1X_2X_3$	$X_1X_2X_4$	$X_1X_3X_4$	$X_2X_3X_4$	$X_1X_2 X_3X_4$	
2,893	-17,032	-4,240	-4,687	-9,115	-6,702	-4,171	

As significâncias estatísticas dos efeitos calculados foram avaliadas ao nível de confiança de 95%. Para identificação da significância dos efeitos, realizou-se o cálculo da variância combinada (s^2), e a partir desta é calculada a variância do efeito (\hat{V}) considerando que s^2 é uma boa estimativa da variância de uma observação com 16 graus de liberdade. O erro dos efeitos (S_{efeito}) foi de 4,682. A partir desses resultados podemos estimar o intervalo de confiança obtido com os resultados anteriores, sendo que o intervalo não deverá incluir o zero para que os efeitos sejam considerados significativos.

A Figura 4 mostra a análise dos efeitos, num gráfico escalado pelo erro dos efeitos ($S_{\text{efeito}} = 4,682$), onde podemos observar as variáveis que apresentam efeitos mais pronunciados no teor de proteína extraída ao nível de 95% de confiança. Foram significativos os efeitos de primeira ordem para: tempo de extração (x_1); temperatura (x_3); e volume do extrator (x_4), já para as interações secundárias foram significativas aquelas entre: tempo de extração e temperatura de extração (x_1x_3); tempo de extração e volume do extrator (x_1x_4); e temperatura de extração e volume do extrator (x_3x_4).

A concentração do extrator não demonstrou ser significativa, no entanto, apresentou valor negativo para o efeito, apontando para a concentração no nível baixo ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) para uma maior eficiência de extração. Observou-se neste nível um percentual de rendimento 8,4% maior em comparação ao nível alto estudado. Portanto, a concentração no nível baixo foi mantida para extrações posteriores. Este resultado está consistente com estudos anteriores de Restelli *et al.*, (2014) e Rigueira *et al.*, (2016), onde empregou-se o Tris/HCl para extração protéica em carne caprina utilizando concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e extração de proteínas em sementes de aveia com concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Estes trabalhos não utilizaram altos valores de concentração de Tris/HCl.

Figura 4 - Efeitos e interações estimadas. *Efeitos significativos



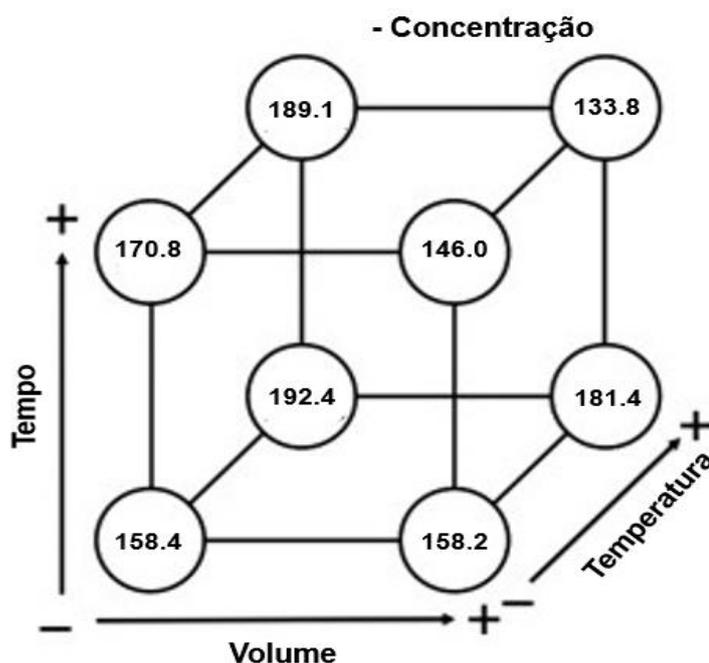
Fonte: Do próprio autor (2017)

De acordo com Araújo *et al.*, (2014) um efeito de primeira ordem deve ser considerado individualmente para interpretação dos resultados somente quando não houver interações, pois as interações prevalecem. Partindo desta premissa, o efeito secundário que apresentou maior influência no estudo foi a interação entre o tempo de extração e volume de extração. A Figura 5 mostra um gráfico cúbico representando as respostas num espaço formado pelos três fatores significativos (fixando x_2 em seu nível baixo). Observa-se que o rendimento diminui de forma pronunciada quando o tempo de extração aumenta (x_1 variando do nível baixo para o alto), a uma temperatura mais alta (x_3 no nível alto), com o maior volume de extrator (x_4 no nível alto). Por outro lado, à temperatura mais baixa, esta diminuição é menor. Isto pode significar que ao usar mais tempo na extração, com maior volume de extrator, a condição mais energética de temperatura favorece uma maior perda de material extraído. Aliado a isto, pode ser visto que os vértices da face esquerda do cubo da Figura 5, correspondente aos ensaios com volume de extrator menor, apresentam os maiores valores de rendimento, quando comparamos com aqueles na face direita do cubo.

A interação do volume do extrator com a temperatura é clara na face inferior do cubo (x_1 no nível baixo, ou seja, menor tempo de extração), quando percorrermos a diagonal que liga os valores de proteína extraída. Nesta direção, a temperatura

aumenta e o volume do extrator diminui o que já era apontado pelo efeito com sinal negativo desta interação. Este fato é condizente com aquele exposto acima, onde um menor volume favorece a extração. Vale ressaltar que apesar de se observar a mesma tendência na face superior do cubo (x_1 no nível baixo, ou seja, menor tempo de extração), os valores de rendimentos são menores.

Figura 5 - Gráfico cúbico das respostas em função das variáveis: tempo, temperatura e volume, usando o nível menor da concentração do extrator (x_2 no nível baixo)



Fonte: Do próprio autor (2017)

Os dados do planejamento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com quatro fatores e seis interações secundárias num total de onze parâmetros (acrescentando-se a média global). Verificou-se, conforme os dados contidos na Tabela 7, que o modelo estatístico para análise da extração de proteína apresentou para regressão um $F_{\text{calculado}}$ (=7,47) maior que o F_{tabelado} (=2,32) para dez graus de liberdade no numerador e vinte e um graus no denominador a um nível de confiança de 95%, indicando que a variância capturada pelo modelo é significativamente maior do que a variância associada aos resíduos, e assim que o modelo é confiável e pode ser usado para fazer previsões. O valor de $F_{\text{calculado}}$ (=1,69) para a falta de ajuste do modelo comparada ao erro puro foi menor que o F_{tabelado} (=2,85) com cinco graus de liberdade no numerador e dezesseis no denominador, evidenciando que não há falta

de ajuste no modelo. Portanto o modelo é estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança. O valor encontrado para R^2 (coeficiente de determinação) foi de 0,78 mostrando que 78% da variação total nos dados se deve às variações dentro dos ensaios estudados e não a erros aleatórios. A máxima variação que poderia ser explicada pelo modelo é 85%, ou seja, esta percentagem é o valor máximo de informação que o modelo poderia capturar.

A avaliação do modelo também pode ser realizada através da observação do gráfico dos valores preditos *versus* valores observados ou experimentais os quais se encontram na Figura 6. A reta mostrada na Figura 6 corresponde à reta de quadrados mínimos obtida na regressão dos valores previstos sobre os valores experimentais. Observa-se que apesar dos valores observados estarem próximos dos valores previstos o coeficiente de correlação entre estas variáveis aleatórias não é próximo de um (coeficiente de correlação = 0,883), o que pode ser calculado através da raiz quadrada do coeficiente de determinação, admitindo que o modelo linear é adequado.

{Equação 8}

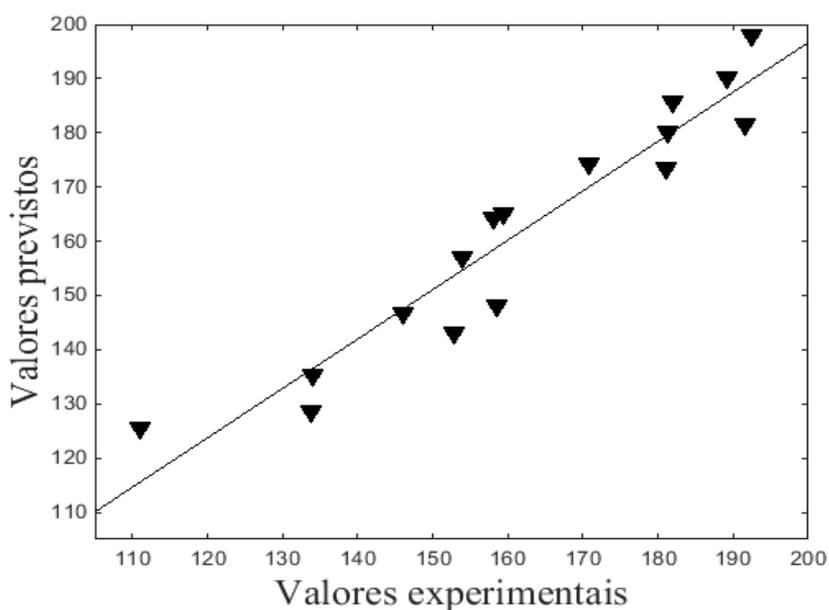
$$\hat{y} = 162,23 - 5,43X_1 + 8,04X_3 - 9,96X_4 - 8,52X_1X_3 - 10,93X_1X_4 - 8,52X_3X_4$$

Tabela 7 - ANOVA para o planejamento 2^4

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade	Média quadrática (MQ)	F_{calc} (95%)	F_{tab} (95%)
Regressão (R)	15262,26	10	763,31	7,47	2,32
Resíduo (r)	4288,2	21	35,3064		
Falta de ajuste (Faj)	1482,87	5	857,6375	1,69	2,85
Erro puro (EP)	2805,2	16	175,3229		
R^2	0,7807				
r máxima variação	0,8565				

O planejamento proposto em dois níveis permitiu construir o modelo linear apresentado na Equação 8, levando em consideração que a resposta varia linearmente com a variação dos níveis nos fatores estudados. Com a análise deste planejamento proposto, pode-se verificar que o modelo não foi suficiente para a otimização do método de extração de proteínas, porém é possível a partir dele realizar uma triagem das variáveis e das interações que se mostram significativas, e assim são mais influentes sobre o sistema estudado. Esta informação obtida é de fundamental importância para o prosseguimento do estudo, pois obter o máximo de informação sobre os fatores que afetam significativamente a extração das proteínas proporciona maior domínio sobre o meio estudado e conseqüentemente resultados mais confiáveis. Diante disto, um novo planejamento fatorial 2^3 com ponto central foi avaliado com as variáveis que se mostraram significativas em novos níveis, com o objetivo de refinar a análise dos fatores propostos sobre a extração de proteínas. Vale lembrar que, o tempo de extração e o volume do extrator apresentaram efeitos negativos, já a temperatura apresentou efeito positivo, ou seja, a eficiência da extração aumenta quando se desloca para o sentido desse nível.

Figura 6 - Gráfico de valores experimentais *versus* valores previstos do modelo linear de interação



Fonte: Do próprio autor (2017)

5.2 Planejamento fatorial 2³ com ponto central

Os resultados obtidos no planejamento fatorial 2⁴ mostraram que as variáveis: tempo de extração, temperatura de extração e volume do extrator foram significativas, bem como a maioria de suas interações. Já a variável concentração do extrator não apresentou efeitos primários ou de interação significativos ao nível de confiança de 95%. Desta forma, esta variável foi fixada em 0,05 mol L⁻¹, para o prosseguimento de novos ensaios.

Tabela 8 - Planejamento fatorial 2³ + ponto central (teor de proteína em mg g⁻¹)

	Ensaio	Variáveis Codificadas			Teor de Proteína
		x ₁	x ₃	x ₄	
Planejamento	E1	-1	-1	-1	166,96
	E2	-1	-1	+1	150,12
	E3	-1	+1	-1	178,39
	E4	-1	+1	+1	153,35
	E5	+1	-1	-1	163,72
	E6	+1	-1	+1	148,44
	E7	+1	+1	-1	181,72
	E8	+1	+1	+1	130,68
Ponto central	E9	0	0	0	192,82
	E10	0	0	0	190,89
	E11	0	0	0	194,92

As três variáveis significativas foram submetidas a um planejamento fatorial 2³ + ponto central. Neste planejamento, cada variável foi estudada em três níveis diferentes (Tabela 3), sendo estes níveis fixados próximos ao valor do efeito + e/ou - de cada variável, esta diferença de cada variável indica que está havendo aumento do rendimento de proteína extraída nos respectivos níveis. A Tabela 8 mostra o planejamento fatorial efetuado com os níveis codificados e os resultados obtidos quando todos os ensaios foram analisados. A média global do teor de proteína para este planejamento foi de 168,36 mg g⁻¹, o que demonstra um aumento de rendimento

no processo de extração quando comparado com o planejamento completo 2^4 (162,23 mg g⁻¹).

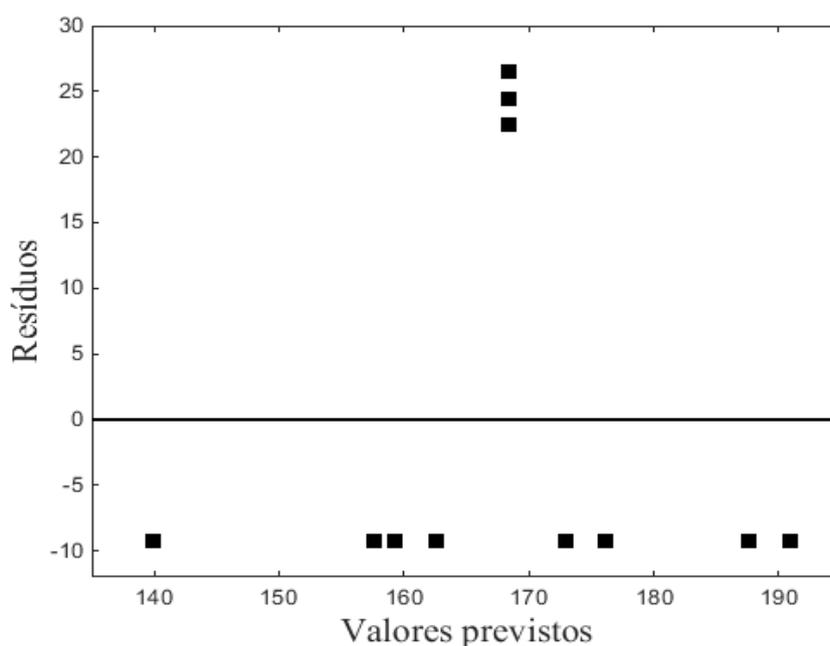
Os dados do novo planejamento foram submetidos a uma ANOVA que indicou conforme os dados contidos na Tabela 9, que o modelo apresentou falta de ajuste para um nível de 95% de confiança. No caso da razão entre a média quadrática da falta de ajuste (MQFaj) e a média quadrática do erro puro (MQEP), o teste F mostrou que estas duas médias quadráticas são estatisticamente diferentes com um $F_{\text{calculado}}$ (= 611,59) maior que o F_{tabelado} (= 18,51) para um grau de liberdade no numerador e dois graus no denominador. Adicionalmente, outro teste F , com base nas médias quadráticas de regressão (MQR) e resíduo (MQR) foi realizado e apresentou um $F_{\text{calculado}}$ (= 0,3451) menor que o F_{tabelado} (= 8,89) com sete graus de liberdade no numerador e 3 no denominador, indicando que as médias quadráticas se mostraram estatisticamente iguais e desta forma o modelo não pode ser utilizado para fazer previsões, uma vez que a variância capturada não difere da variância dos resíduos. O valor de R^2 foi igual a 0,44 explicando apenas 44% da variância total dos dados ao redor da média, já o $r_{\text{máximo}}$ foi igual a 0,9982 o que sugere que o modelo poderia explicar 99,82% da variação total.

Tabela 9 - ANOVA para o planejamento 2^3 + ponto central

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade	Média quadrática (MQ)	F_{calc} (95%)	F_{tab} (95%)
Regressão (R)	2002,0	7	286,00	0,3451	8,89
Resíduo (r)	2486,4	3	828,79		
Falta de ajuste (Faj)	2478,3	1	2478,3	610,41	18,51
Erro puro (EP)	8,13	2	4,06		
R^2	0,4460				
r máxima variação	0,9982				

O gráfico dos resíduos do modelo está apresentado na Figura 7. Observando este gráfico considera-se que o modelo não explica consideravelmente os dados experimentais, visto que a distribuição dos resíduos não está aleatória em volta do zero, ou seja, o resíduo apresenta uma estrutura uniforme e esta informação pode ser comprovada com o baixo coeficiente de determinação obtido na ANOVA, que foi igual a 0,44 (valor de R^2 na tabela 9), sendo considerado pouco satisfatório para que pudesse correlacionar os valores previstos pelo modelo com os valores observados experimentalmente.

Figura 7 - Gráfico de resíduos do modelo linear de interação



Fonte: Do próprio autor (2017)

A equação que descreve o modelo linear está descrita a baixo na Equação 9:

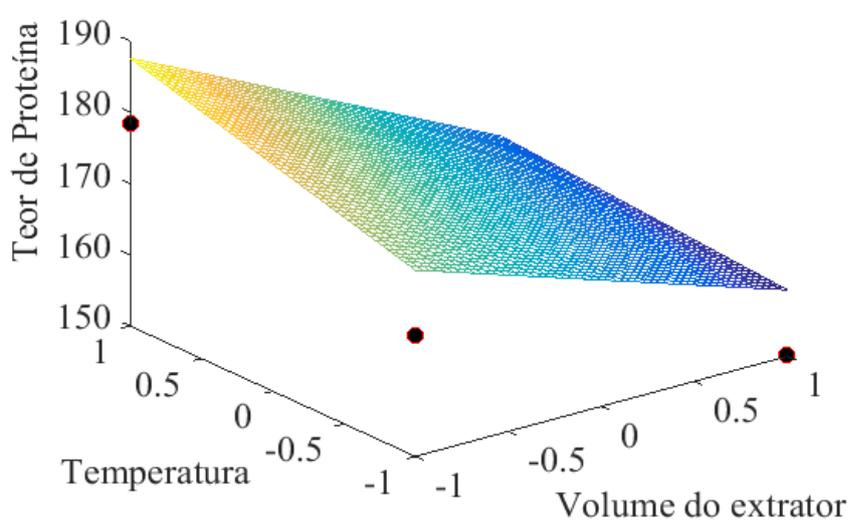
{Equação 9}

$$\hat{y} = 168,36 - 3,03X_1 + 1,86X_3 - 13,52X_4 - 1,80X_1X_3 - 3,05X_1X_4 - 5,49X_3X_4 - 3,44X_1X_3X_4$$

Através da Equação 9 pode-se construir uma superfície de resposta descrevendo possíveis valores de teor de proteínas extraído dentro do espaço experimental investigado. Na Figura 8 tem-se o gráfico de superfície resposta do modelo linear para a temperatura de extração e volume do extrator, estando a variável

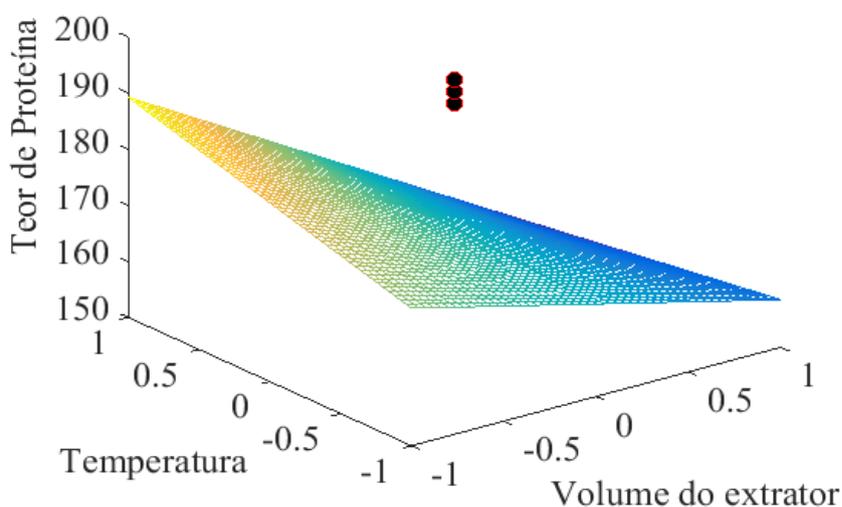
“tempo de extração” fixada no nível baixo (-1). A Figura 9 mostra o gráfico de superfície reposta do modelo linear com a variável “tempo extração” fixada no ponto central (0). Observa-se nas Figuras 8 e 9 que os resultados experimentais não são bem descritos pela superfície de resposta, estando muito distantes desta. Isto confirma os resultados da ANOVA que indicou falta de ajuste para o modelo. O modelo estatístico tem por função permitir a construção da superfície de resposta, no entanto, para isto, o mesmo deve ser válido, ou seja, ele deve representar de forma adequada os resultados experimentais (BREITKREITZ; SOUZA; POPPI, 2014).

Figura 8 – Superfície de resposta mantendo o tempo de extração no nível baixo (-1)



Fonte: Do próprio autor (2017)

Figura 9 – Superfície de resposta mantendo o tempo de extração no ponto central (0)



Fonte: Do próprio autor (2017)

A baixa qualidade do modelo pode ser verificada também através dos altos resíduos deixados por este para os pontos experimentais centrais (Figura 8). A pobre descrição da região próxima ao ponto central é evidente na Figura 9, indicando que possivelmente há uma curvatura na superfície de resposta que não é obtida com o modelo linear. Ainda na Figura 9, percebe-se que os valores observados no ponto central são mais altos do que aqueles previstos com o modelo mostrado.

Para analisar a existência da curvatura citada acima, calculou-se o intervalo de confiança para a diferença entre a média dos valores observados no ponto central e a média global obtida com as respostas nos oito ensaios do planejamento fatorial 2^3 . O intervalo de confiança foi [-39,57; -27,82] e como ele não inclui o zero, a curvatura no modelo é significativa, fato que demonstra a necessidade de um novo modelo com ajuste mais apropriado aos dados experimentais. Um modelo quadrático pode demonstrar uma maior flexibilidade para abranger as informações ao redor do ponto central. Desta forma, um modelo quadrático foi proposto, inserindo-se pontos axiais para uma análise mais refinada do sistema.

5.3 Planejamento composto central de face centrada

Após a realização do planejamento 2^3 com ponto central foi observado que o modelo linear não representava adequadamente os dados experimentais e que uma curvatura significativa no domínio experimental investigado deveria ser observada. Partiu-se então para ampliação do modelo, acrescentando termos quadráticos, buscando informações mais detalhadas da região estudada e um melhor ajuste para descrição dos resultados. Para que o modelo se tornasse quadrático realizou-se novos experimentos com pontos axiais (Tabela 10). Com os resultados obtidos obteve-se uma média global para o teor de proteína ($172,51 \text{ mg g}^{-1}$) superior aos demais planejamentos realizados anteriormente, o que demonstra o ganho na extração com os novos níveis propostos para as variáveis estudadas.

A partir dos novos experimentos obtidos foi possível avaliar o novo modelo gerado através do gráfico de valores previstos *versus* valores experimentais, gráfico de resíduos e pela ANOVA.

Na Figura 10 pode-se observar o gráfico dos valores previstos pelo modelo quadrático *versus* os valores obtidos experimentalmente. Este gráfico demonstra que

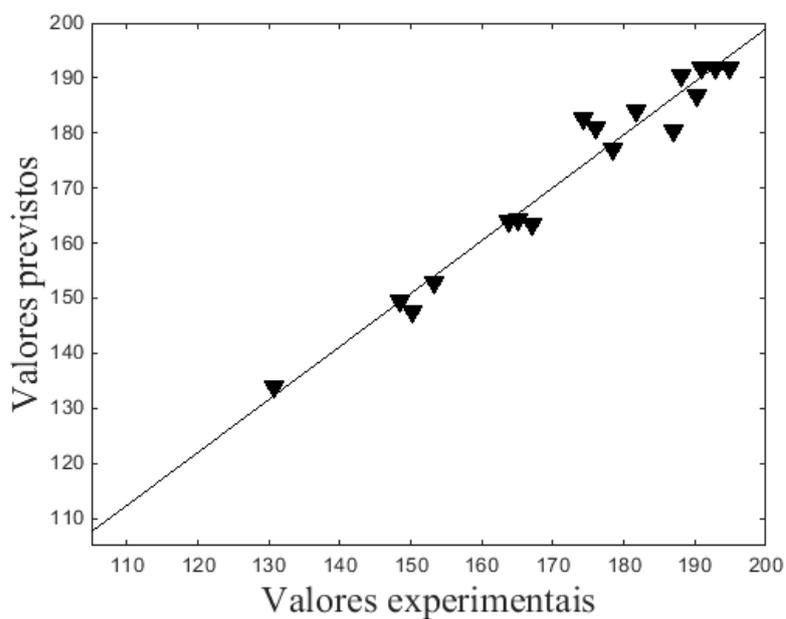
o modelo quadrático descreve bem os valores experimentais indicando um modelo bem ajustado, o que pode ser apontado também pelo alto valor do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9624$).

O gráfico de resíduos na Figura 11 mostra que os resíduos estão distribuídos aleatoriamente ao redor do zero, ou seja, nenhuma estrutura é observada para estes. A distribuição aleatória dos resíduos é um requisito necessário para a confirmação se um modelo matemático está adequado aos dados experimentais. Examinando o gráfico de resíduos do modelo linear (Figura 7) e aquele para o modelo quadrático (Figura 11) podemos constatar que este último é de fato superior, pois os resíduos mostram-se mais bem espalhados ao redor do zero.

Tabela 10 - Planejamento composto central de face centrada (teor de proteína em mg g⁻¹)

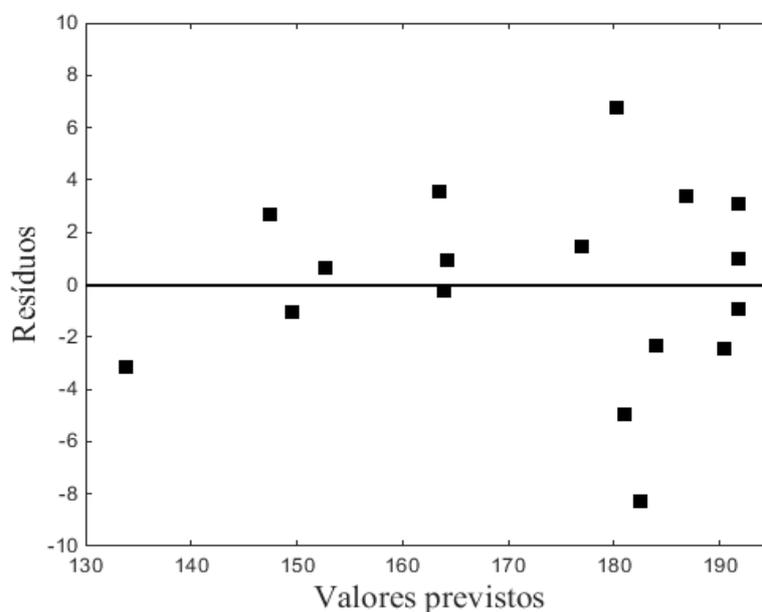
	Ensaio	Variáveis Codificadas			Teor de Proteína
		x_1	x_3	x_4	
Planejamento	E1	-1	-1	-1	166,96
	E2	-1	-1	+1	150,12
	E3	-1	+1	-1	178,39
	E4	-1	+1	+1	153,35
	E5	+1	-1	-1	163,72
	E6	+1	-1	+1	148,44
	E7	+1	+1	-1	181,72
	E8	+1	+1	+1	130,68
Ponto central	E9	0	0	0	192,82
	E10	0	0	0	190,89
	E11	0	0	0	194,92
Pontos axiais	E12	-1	0	0	174,25
	E13	+1	0	0	187,01
	E14	0	-1	0	176,06
	E15	0	+1	0	190,20
	E16	0	0	-1	188,02
	E17	0	0	+1	165,16

Figura 10 - Gráfico de valores experimentais *versus* valores previstos do modelo quadrático



Fonte: Do próprio autor (2017)

Figura 11 - Gráfico de resíduos do modelo quadrático



Fonte: Do próprio autor (2017)

A ANOVA do modelo quadrático é mostrada na Tabela 11. Através da ANOVA confirma-se o que foi observado a partir do gráfico de resíduos e do gráfico de valores previstos *versus* valores experimentais. O modelo não apresentou falta de ajuste, uma vez que um teste *F* para a média quadrática devido à falta de ajuste relacionada com

a média quadrática devido ao erro puro mostrou que estas variâncias não são significativamente diferentes. O valor de $F_{\text{calculado}}$ foi 12,26, inferior ao F_{tabelado} (= 19,25) para quatro graus de liberdade no numerador e dois graus de liberdade no denominador a um nível de confiança de 95%. O modelo quadrático explica 96% da variação presente nos ensaios analisados, bastante superior àquela explicada pelo modelo linear com valor de 44%.

Estudo anterior para otimização da extração de proteínas em sementes de melancia relatou um valor de R^2 igual 83,9% (WANI *et al.*, 2008), Durmus e Evranuz (2010) encontrou um R^2 igual 96,7% para sementes de pimenta vermelha e Mizubiti *et al.*, (2000) encontrou R^2 igual 74,48% para extração de proteínas do feijão. O teste F para a variância capturada pelo modelo quadrático relacionada com a variância dos resíduos mostrou que a primeira é significativamente maior do que a segunda. O valor de $F_{\text{calculado}}$ foi 15,35, superior ao F_{tabelado} (= 4,06) para dez graus de liberdade no numerador e seis graus de liberdade no denominador a um nível de confiança de 95%. Isto confirma a robustez do modelo no que diz respeito à previsão do teor de proteína extraído dentro da janela experimental estudada. A variação máxima explicável pelo modelo foi de 99%.

Podemos constatar com os resultados a cima que o modelo quadrático apresenta um ajuste altamente significativo, sendo muito melhor do que o modelo linear. Como não há sinal de falta de ajuste, podemos construir o modelo empírico com os intervalos de confiança para os parâmetros do modelo (Equação 10) e a partir desta equação analisar a superfície de resposta.

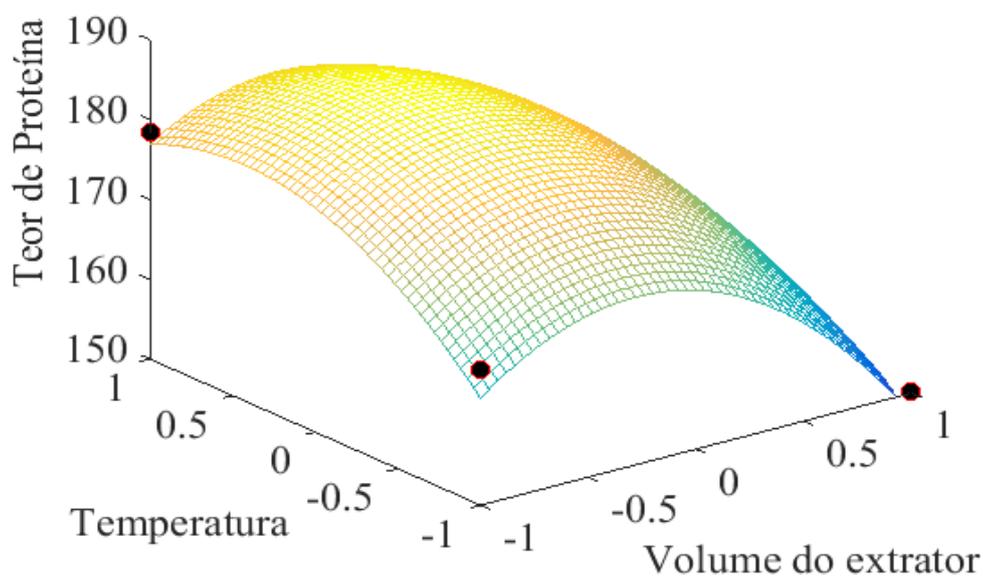
{Equação 10}

$$\hat{y} = 191,84 - 1,15X_1 + 2,90X_3 - 13,10X_4 - 10,44X_1^2 - 7,93X_3^2 - 14,48X_4^2 - 1,80X_1X_3 - 3,05X_1X_4 - 5,49X_3X_4 - 3,44X_1X_3X_4$$

Tabela 11 - ANOVA para o planejamento composto de face centrada

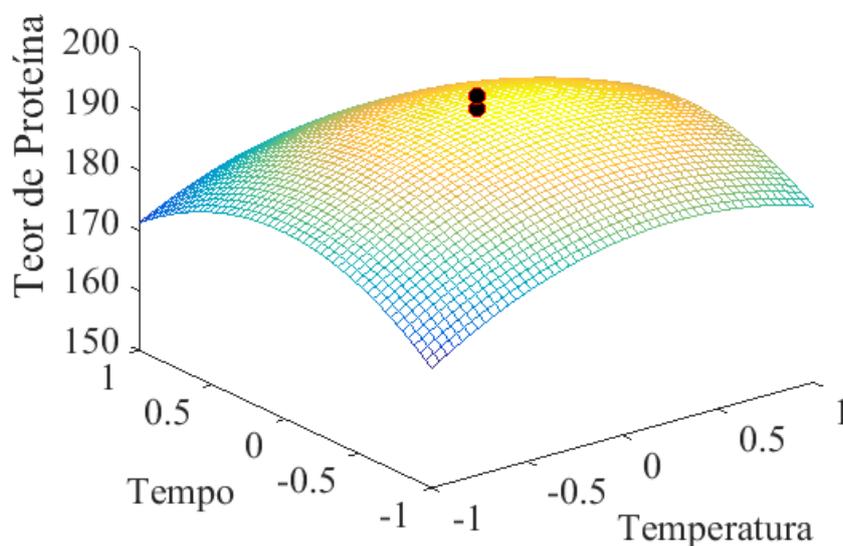
Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade	Média quadrática (MQ)	F_{calc} (95%)	F_{tab} (95%)
Regressão (R)	5303,6	10	530,36	15,35	4,06
Resíduo (r)	207,30	6	34,55		
Falta de ajuste (Faj)	199,17	4	49,79	12,26	19,25
Erro puro (EP)	8,13	2	4,06		
R^2	0,9624				
r máxima variação	0,9985				

Utilizando a Equação 10 do modelo quadrático, três superfícies de resposta são construídas. Nas Figuras 12, 13 e 14 podemos observar os gráficos de superfície resposta para o modelo quadrático.

Figura 12 – Superfície de resposta do modelo quadrático mantendo o tempo de extração no nível baixo (-1)

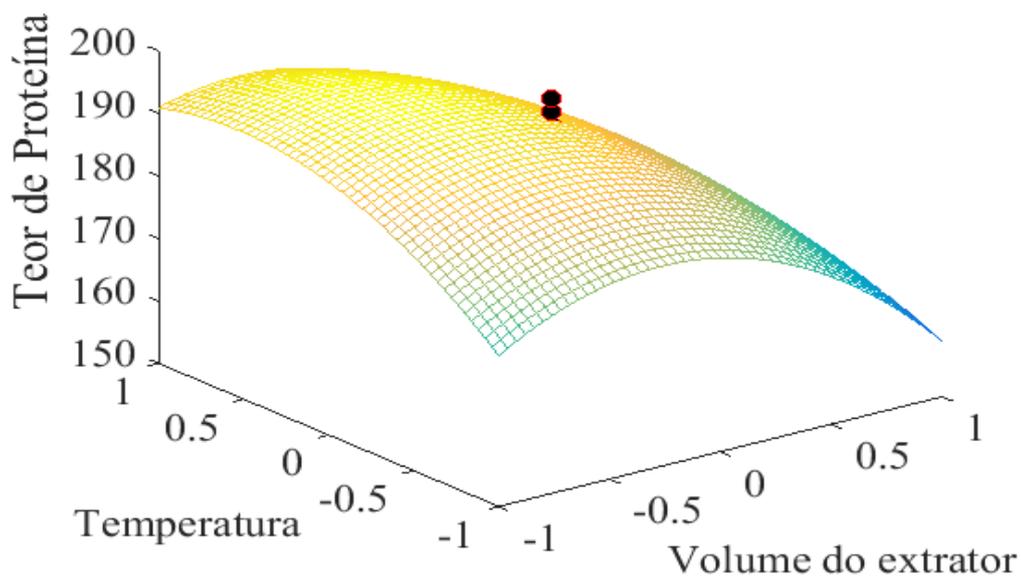
Fonte: Do próprio autor (2017)

Figura 13 – Superfície de resposta do modelo quadrático mantendo o volume do extrator no ponto central (0)



Fonte: Do próprio autor (2017)

Figura 14 – Superfície de resposta do modelo quadrático mantendo o tempo de extração no ponto central (0)



Fonte: Do próprio autor (2017)

Nas Figuras 12, 13 e 14, podemos visualizar os dados experimentais indicados por pontos pretos e as suas proximidades com as superfícies de resposta. Comparando-se com as Figuras 8 e 9 que mostram as superfícies de resposta para o modelo linear, nota-se que o ajuste aos dados experimentais para o modelo quadrático é melhor do que o ajuste para o modelo linear, onde os pontos pretos ficam

muito acima ou abaixo da superfície resposta. Estas observações corroboram com os resultados da ANOVA e o gráfico de resíduos, ambos para o modelo quadrático, e nos levam a conclusão que este modelo é o mais adequado para fazer previsões sobre o domínio experimental estudado. Adicionalmente, a Equação 11 correspondente à função matemática do modelo quadrático utilizando a variância combinada do planejamento 2^4 mais a variância do modelo quadrático no ponto central, onde apenas os coeficientes que se mostraram significativos ao nível de 95% de confiança é mostrada abaixo:

{Equação 11}

$$\hat{y} = 191,84 - 13,10X_4$$

A superfície de resposta obtida mostrando as variáveis, tempo de extração *versus* temperatura, representada na Figura 13, mostra que o aumento na eficiência da extração está tendendo para próximo do ponto central no eixo da variável tempo, por outro lado o máximo da curva está situado do lado positivo da escala da variável temperatura. Desta forma, a máxima eficiência de extração ocorre num tempo de 10 minutos, sendo esta observação interessante para futuras análises, pois ao reduzir o tempo de extração pela metade (considerando o maior tempo utilizado no estudo da triagem das variáveis) exige-se menos esforço dos analistas, aliado a um menor consumo de energia elétrica com os equipamentos.

Trabalhos descritos na literatura como o de Wani *et al.*, (2006) estudaram o tempo de extração de proteínas em 5, 10, 15, 20 e 25 minutos, sendo o tempo fixado em 15 minutos como ótimo. Em outro trabalho, Drumus e Evranuz (2010) investigaram o tempo de extração de 20, 30, 40, 50 e 60 minutos, onde obtiveram o máximo de extração proteica em 20 minutos. Diante destes resultados, pode-se observar que a quantidade de proteína extraída tende a ser maior até certo tempo de extração alcançando um limite, mas a partir deste, à medida que se aumenta o tempo de extração não há variação de material extraído, ou seja, a quantidade de produto disponível se mantém constante.

Através da superfície de resposta para o volume do extrator *versus* temperatura de extração (Figura 14), obtida mantendo-se o tempo de extração no nível zero (10 minutos), pode ser observado que além do lado positivo da escala de temperatura, o máximo da curva se posiciona do lado negativo da escala da variável

volume do extrator. De fato, utilizando uma análise gráfica ou calculando o ponto de máximo da superfície de resposta com as derivadas parciais da Equação 10 é possível determinar o ponto onde a eficiência de extração é máxima. Este ponto crítico corresponde aos valores: tempo de extração, nível zero ou 10 minutos; temperatura, nível 0,4 ou 44 °C; e volume de extração, nível -0,5 ou 3,5 mL. Vale ressaltar que o rendimento teórico (19,58 g de proteína por 100 g de carne caprina) obtido no ponto crítico não é significativamente diferente do rendimento médio (19,29 g de proteína por 100 g de carne caprina) obtido no ponto central, o que foi verificado com um teste t a 95% de confiança e dois graus de liberdade, utilizando a incerteza experimental no ponto central.

Diante da análise acima, uma extração com um pequeno volume (3,5 mL) mostrou-se eficiente na extração das proteínas. Neste contexto, podemos citar que é desejável sempre que possível conduzir experimentos de forma econômica, tanto do ponto de vista do tempo, quanto do ponto de vista dos reagentes. Este último ponto pode ainda ser relacionado aos princípios da química verde, no contexto da geração do menor resíduo possível.

No tocante ao aumento de temperatura de extração, quando comparado ao estudo inicial com as temperaturas de 25 e 40 °C, o aumento no rendimento de extração pode estar associado ao fato de que a condição mais energética ajuda a remover as interações inter e intramolecular das proteínas, tornando assim mais fácil a solubilidade das mesmas na solução extratora. Apesar disso, este estudo mostra que existe um limite no crescimento do rendimento de extração com o aumento de temperatura. De fato, nos experimentos realizados a 50 °C observou-se um extrato protéico com menor volume, além de se observar uma aglomeração viscosa entre a carne caprina e a solução extratora, o que pode estar levando a uma diminuição na quantidade de proteína extraída. Estas observações também foram mencionadas por Chee, Ling e Ayob (2012), onde estes afirmam que temperaturas acima de 60 °C diminuem a extractabilidade da proteína devido à desnaturação e aglomeração.

Os autores L'Hocine e Pitre (2016), mencionam que temperaturas acima de 50 °C não são aconselháveis para se realizar a extração de proteínas, uma vez que pode levar a desnaturação irreversível destas. Estudos de *Wani et al.*, (2008) avaliaram temperaturas de extração de proteínas a 40, 45, 50, 55 e 60 °C, obtendo o ponto ótimo extração em 50 °C. Adicionalmente, Ma, Wang e Wu (2010) investigaram as temperaturas de extração entre 25, 40 e 55 °C, sendo 40 °C a temperatura ótima.

Diante das indagações de vários autores a respeito do efeito da temperatura na integridade das proteínas extraídas, resolveu-se avaliar por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-SEC-DAD) a influência da elevação da temperatura na conformação destas biomoléculas. Estes resultados são comentados a seguir.

Normalizando (concentração de proteína em g por 100g) e comparando o teor total de proteína encontrado nos pontos máximos de cada variável otimizada que foi igual a 19,29 g de proteína por 100 g de carne caprina. Este valor é superior àquele reportado por Lopes *et al.*, (2014) onde o teor de proteína variou de 16,7 a 17,8 g por 100g de carne nas raças: canindé; moxotó; e boer. Amaral *et al.*, (2007) encontrou um teor de proteína de 16,5 g por 100g de carne para caprinos saanen. No trabalho de Madruga *et al.*, (2005) onde os autores avaliaram diferentes cortes, tais como: paleta, perna, lombo, costela e pescoço, o corte que apresentou um teor maior de proteína foi o da perna sendo igual a 22,9 g por 100g de carne caprina. Tomovic *et al.*, (2016) reporta um valor máximo de teor de proteína igual a 20,69 g por 100g de carne caprina. O estudo de Turner *et al.*, (2014) relatou um teor de 22,5 g de proteína por 100 g desta carne. Vale ressaltar que o teor de proteína presente na carne caprina é influenciado pela idade do animal, tipo de corte e alimentação.

É importante relatar que a maioria dos trabalhos descritos acima fazem a determinação do teor de proteínas de acordo com a AOAC, sendo o método de indicado o de “Kjeldahl”, que determina o teor de nitrogênio total em proteínas, sendo que para tal determinação destrói completamente estas biomoléculas.

Estes resultados demonstram a eficiência da otimização da extração aqui reportada, na qual observou valores próximos aos relatados na literatura e não necessita destruir a integridade das proteínas.

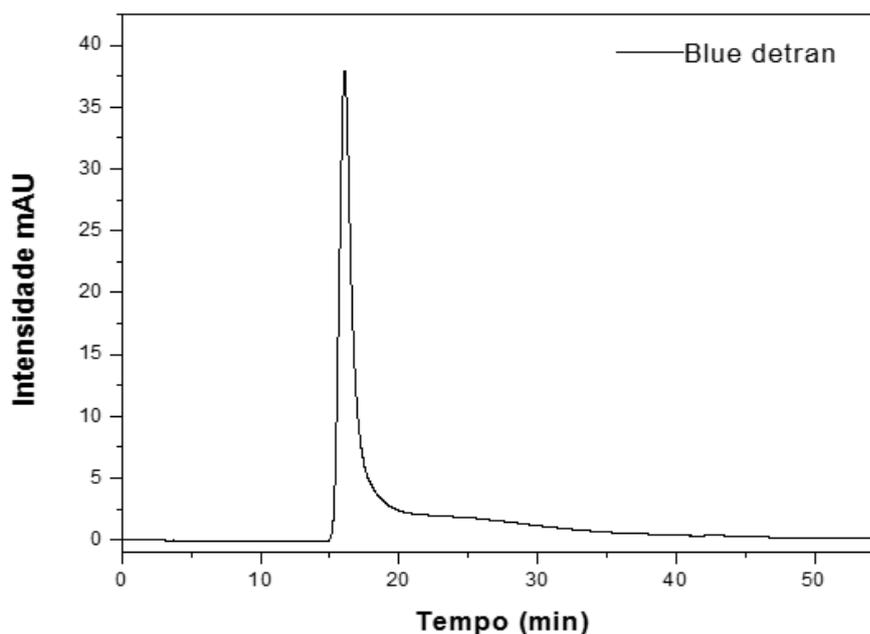
5.4 Avaliação do efeito da temperatura no perfil proteômico por HPLC-SEC-DAD

Para a predição das massas moleculares das proteínas e avaliação do perfil proteômico dos extratos obtidos, foi feita uma calibração da coluna cromatográfica. Para isto o primeiro passo foi a determinação do volume morto da coluna, sendo injetado na coluna um padrão de blue dextran de massa molar de 2000 kDa. Considera-se que esse padrão tem massa molecular muito elevada sendo excluído

completamente da coluna num tempo mínimo, ou seja, todos compostos que eluem num tempo menor do que aquele do blue dextran (Figura 15) possuem uma menor ou nenhuma interação com o mecanismo de separação da coluna cromatográfica. Diante disto, considera-se que estes compostos não serão respeitados para fins de estimação de suas massas.

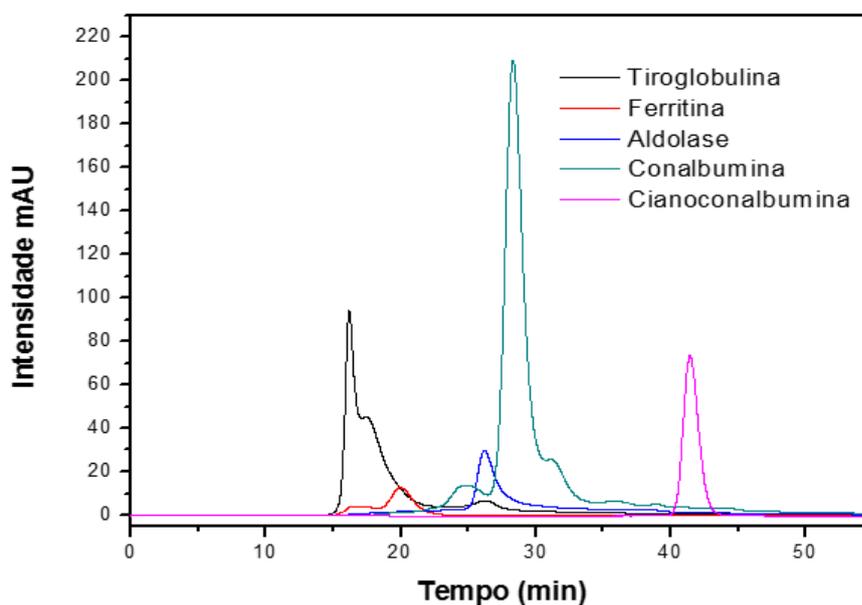
Após a determinação do volume morto da coluna, foram injetados cinco padrões de proteínas com diferentes massas moleculares. Os padrões utilizados foram: tiroglobulina (669 kDa); ferritina (440 kDa); aldolase (158 kDa); conalbumina (75 kDa); cianoconalbumina B12 (1,35 kDa). As injeções foram feitas separadamente e os seus respectivos cromatogramas são mostrados na Figura 16.

Figura 15 - Cromatograma do padrão blue dextran com detecção no comprimento de onda de 280 nm



Fonte: Do próprio autor (2017)

Figura 16 - Cromatograma de todos os padrões com detecção no comprimento de onda de 280 nm

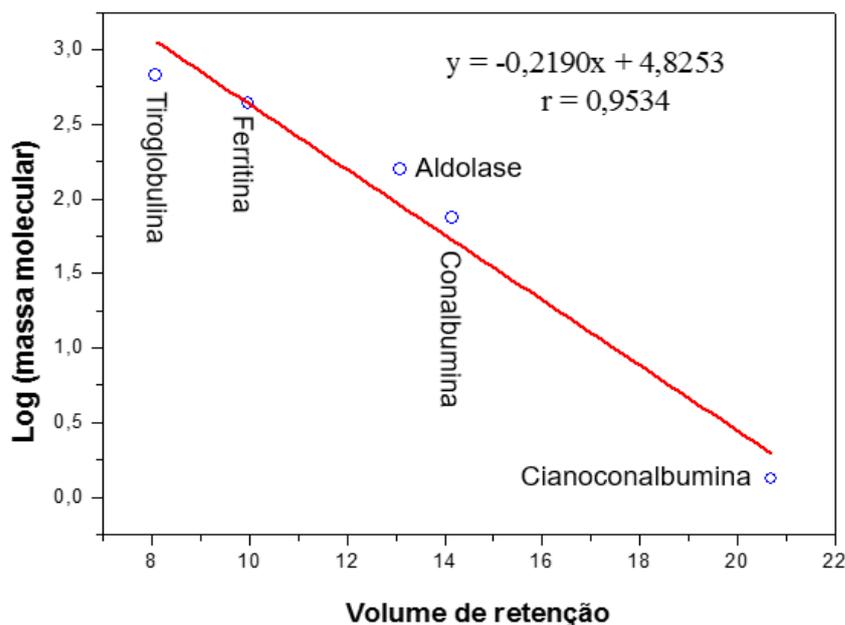


Fonte: Do próprio autor (2017)

Após a injeção dos padrões, construiu-se uma curva de calibração do logaritmo da massa molar das proteínas em função de seus volumes de eluição (Figura 17), obtendo um valor de coeficiente de correlação, $r = 0,95$ e a reta de regressão mostrada na Equação 12, que foi utilizada para a estimativa das massas molares dos compostos eluidos na coluna. Na Equação 12, y representa a massa molar da proteína e x indica o volume de retenção obtido experimentalmente.

$$\log y = -0,2190x + 4,8253 \quad \{\text{Equação 12}\}$$

Figura 17 – Curva de calibração da coluna de exclusão por tamanho

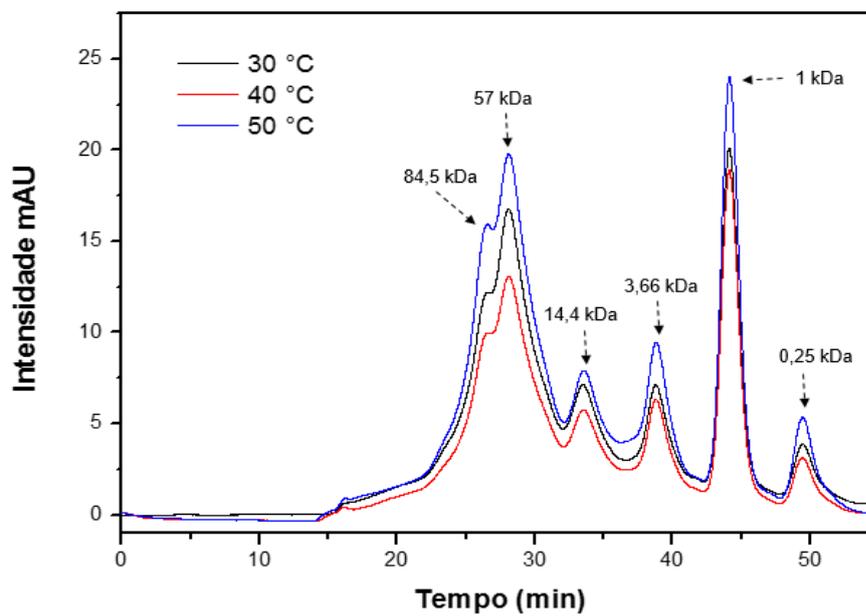


Fonte: Do próprio autor (2017)

Após a calibração da coluna investigou-se por HPLC-SEC-DAD os perfis cromatográficos dos extratos obtidos, no intuito de verificar se as temperaturas estudadas nos ensaios provocariam a desnaturação das proteínas. De fato, este é um ponto citado por diversos autores (L'HOCINE; PITRE, 2016, CHEE; LING; AYOB, 2012) que argumentam que o aumento da temperatura pode ocasionar a quebra ou a mudança conformacional das biomoléculas.

Os resultados obtidos dos extratos submetidos às temperaturas de 30, 40 e 50°C estão apresentados na Figura 18. Comparando-se os perfis cromatográficos dos extratos analisados, observa-se que os três extratos apresentaram moléculas de alta massa molecular, acima de 10 kDa, e de baixa massa molecular, abaixo de 10 kDa. O perfil proteômico entre os ensaios analisados não foi alterado significativamente, o que permite afirmar que a extractabilidade das proteínas na temperatura de 44 °C mostra-se adequada, uma vez que preserva a conformação dessas biomoléculas. É importante ressaltar que a integridade das estruturas das proteínas é fundamental para os estudos de proteômica, que consideram as conformações, interações, funções e atividades biológicas destas biomoléculas.

Figura 18 - Perfil HPLC-SEC-DAD com detecção no comprimento de onda de 280 nm para os extratos da carne caprina obtidos nas temperaturas de 30, 40 e 50°C



Fonte: Do próprio autor (2017)

6 CONCLUSÕES

Os estudos apresentados neste presente trabalho levaram as seguintes conclusões:

- ✓ O planejamento fatorial 2^4 empregado na triagem das variáveis para extração das proteínas da carne revelou a significância dos efeitos das variáveis: tempo de extração; temperatura; e volume do extrator. Além disso, suas interações entre: tempo de extração e temperatura de extração; tempo de extração e volume do extrator; e temperatura de extração e volume do extrator.
- ✓ O modelo quadrático proposto para os dados experimentais não apresentou falta de ajuste e revelou o coeficiente de determinação de 0,96, o que explica 96% da variação presente nos ensaios estudados, o que demonstra ser razoável para o modelo. O teste *t* de *student* revelou que não houve diferença significativa entre o valor máximo previsto pelo modelo e a média do ponto central.
- ✓ Com a equação final do modelo empírico gerado e análise do gráfico de superfície resposta, pode-se chegar ao principal objetivo desta dissertação, que é utilizar a otimização multivariada para maximizar o teor de proteína extraída. Sendo as condições ótimas de trabalho estabelecidas com 0,05 mol L⁻¹ de Tris/HCL pH 7,3, tempo de extração em 10 minutos, temperatura de extração de 44°C e volume do extrator de 3,5 mL.
- ✓ O teor de proteína extraído foi significativamente maior do que alguns relatados na literatura, demonstrando a grande capacidade do procedimento aqui apresentado. Este fato ganha maior importância quando colocado nos contextos da Química Verde, que advoga para um menor consumo de reagentes e de energia, e da Proteômica, que objetiva o estudo do conteúdo total de proteínas de diversos sistemas biológicos.
- ✓ Os cromatogramas obtidos para as temperaturas aqui estudadas sugerem que o perfil cromatográfico não sofre grande mudança na temperatura mais alta, preservando-se as proteínas do ponto de vista estrutural.
- ✓ Todas essas informações obtidas são de fundamental importância para otimização do método de extração, pois ao se descobrir as condições que

maximizam o teor das proteínas extraídas obtêm-se um limite de trabalho relevante ao preparo da amostra.

- ✓ Portanto, o método proposto para otimização do processo de extração de proteínas a partir da carne caprina, revelou-se um procedimento moderadamente simples, rápido e barato, capaz de produzir concentrados confiáveis de proteínas.

6.1 Sugestões para trabalhos futuros

De acordo com os resultados adquiridos no presente estudo, podemos sugerir que num futuro próximo sejam realizados os seguintes trabalhos:

- ✓ Empregar a metodologia desenvolvida em amostras de carne caprina de diferentes raças exploradas no Piauí.
- ✓ Investigar o proteoma caprino com a metodologia desenvolvida.

REFERÊNCIAS

ADEYEMI, K. D.; SABOW, A. B.; SHITTU, R. M.; KARIM, R.; SAZILI, A. Q. Influence of dietary canola oil and palm oil blend and refrigerated storage on fatty acids, myofibrillar proteins, chemical composition, antioxidant profile and quality attributes of semimembranosus muscle in goats. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6:51, p. 1-13, 2015.

ALVES, L. F.; ROCHA, M. S.; GOMES, C. C. F. Avaliação da Qualidade Protéica da Quinoa Real (*Chenopodium Quinoa Wild*) Através de Métodos Biológicos. *E-scientia*. Belo Horizonte. v. 1. n. 1. 2008.

AMARAL, C. M. C.; PELICANO, E. R. L.; YAÑEZ, E. A.; SOUZA, H. B. A.; MACHADO, M. R. F.; SUGOHARA, A.; RESENDE, K. T. Características de carcaça e qualidade de carne de cabritos Saanen alimentados com ração completa farelada, peletizada e extrusada. **Ciência Rural**, v.37, n.2, 2007.

AOAC (2000). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, (seventeenth ed.). Washington, DC: The Association of Official Analytical Chemists.

ARAÚJO, J. E.; OLIVEIRA, E.; OTERO-GLEZ, A.; SANTOS NORES, J.; IGREJAS, G.; LODEIRO, C.; CAPELO, J. L.; SANTOS, H. M. A comprehensive factorial design study of variables affecting protein extraction from formalin-fixed kidney tissue samples. **Talanta**, v. 119, p. 90-97, 2014.

ATRACHE, L. F.; SGHAIER, R. B.; KEFI, B.; HALDYS, V.; DACHRAOUI, M.; TORTAJADA, J. Factorial design optimization of experimental variables in preconcentration of carbamates pesticides in water samples using solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray–mass spectrometry determination. **Talanta**, v. 117, p. 392-398, 2013.

BAS, D.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 836–845, 2007.

BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na indústria, 4^o ed, Porto Alegre: Bookman, 2010.

BEVERUNG, C. J.; RADKE, C. J.; BLANCH, H. W. Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. **Biophysical Chemistry**, v. 81, p. 59–80, 1999.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

BRADFORD, M. M.. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDA, J.; KULOZIK, U. Impact of the substrate viscosity, potentially interfering proteins and further sample characteristics on the ion exchange efficiency of tangential flow membrane adsorbers. **Food and Bioproducts Processing**, v. 2, p. 90-97, 2017.

BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Química nova**, v. 37, n. 3, p. 564-573, 2014.

BRESSANI, R. Revisión sobre la calidad del grano de frijol. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 39, n. 3, p. 419-442, 1989.

CANAS, B.; PINEIRO, C.; CALVO, E.; FERRER, D. L.; GALLARDO, J. M. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 235-258, 2007.

CASSIDY, A. Physiological effects of phyto-oestrogens in relation to cancer and other human health risks. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 55, p. 399-417, 1996.

CHEE, K. L.; LING, . K.; AYOB, M. K. Optimization of trypsin-assisted extraction, physico-chemical characterization, nutritional qualities and functionalities of palm kernel cake protein. **Food Science and Technology**, v. 46, p. 419-427, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.; Fundamentos de Cromatografia. 1ª ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.

COZZOLINO, S. M. Biodisponibilidade de Nutrientes. 1 ed. São Paulo: Manole, 2005.

DAMODARAN, S. Food proteins: an overview. **Food Proteins and Their Applications**, v.1, p. 1–24, 1997.

DANIELSEN, M.; PEDERSEN, L. J.; BENDIXEN, E. An in vivo characterization of colostrum protein uptake in porcine gut during early lactation. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 101-109, 2011.

DEGANI, A. L. G.; CASS Q. B.; VIEIRA P. C.; Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova**, n. 7, p. 21-25, 1998.

DEVLIN, T. M.; MICHELACCI, Y. M. Manual de bioquímica: com correlações clínicas. 7. ed. São Paulo: Blucher, 2011.

DRAPALA, K. P.; AUTY, M. A. E.; MULVIHILL, D. M.; O'MAHONY, J. A. Influence of lecithin on the processing stability of model whey protein hydrolysate-based infant formula emulsions. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68, p. 322–333, 2015.

DURMUS, E. F.; EVRANUZ, O. Response surface methodology for protein extraction optimization of red pepper seed (*Capsicum frutescens*). **Food Science and Technology**, v. 43, p. 226-231, 2010.

FAO (2014). Food and agriculture organization of the United Nations statistical databases. <http://faostat.fao.org/> (acesso em 21.10.2016).

FEKETE, S.; GUILLARME, D. Ultra-high-performance liquid chromatography for the characterization of therapeutic proteins. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 63, p. 76-84, 2014.

FIGUEIREDO, E. C.; BORGES, k. B.; QUEIROZ, M. E. C. Preparo de amostra para análise de compostos orgânicos. 1ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

FUJIMOTO, J.; REIS, E. A. O.; PETRI, D. F. S.; CAMPANHA FILHO, S. P. Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteínas. **Química Nova**, v. 25, p. 757-761, 2002.

GARCIA, J. L. L.; NEUBERT, T. A. Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 259-276, 2007.

GARLICK, P. J.; MCNURLAN M. A.; BALLMER, P. E. Influence of dietary protein intake on whole-body protein turnover in humans. **Diabetes Care**, v. 14, p. 1189–98, 1991.

GILMOUR, S. G. Response Surface Designs for Experiments in Bioprocessing. **Biometrics**, v. 62, p. 323–331, 2006.

GIODANO M, CASTELLINO P. Correlation between amino acid induced changes in energy expenditure and protein metabolism in humans. **Nutr**, v. 44, p. 13:309-12, 1997.

GOYONA, A.; BECK, A.; COLAS, O.; SANDRAC, K.; GUILLARMEA, D.; FEKETE, S. Evaluation of size exclusion chromatography columns packed with sub-3 μm particles for the analysis of biopharmaceutical proteins. **Journal of Chromatography A**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.056>, 2016.

GOYON, A.; GUILLARME, D.; FEKETE, S. The importance of system band broadening in modern size exclusion chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 135, p. 50-60, 2017.

GRIGOROVICH, N. V.; MOISEENKO, D. V.; ANTIPOVA, A. S.; ANOKHINA, M. S.; BELYAKOVA, L. E.; POLIKARPOV, Y. N.; BARANOV, B. A. Structural and thermodynamic features of covalent conjugates of sodium caseinate with maltodextrins underlying their functionality. **Food & Function**, v. 3, 283–291, 2012.

GUERRA, I. C. D.; FÉLEX, S. S. S.; MEIRELES, B. R. L. M.; DALMÁS, P. S.; MOREIRA, R. T.; HONÓRIO, V. G.; MORGANO, M. A.; MILANI, R. F.; BENEVIDES, S. D.; QUEIROGA, R. C. R. E.; MADRUGA, M. S. Evaluation of goat mortadella prepared with different levels of fat and goat meat from discarded animals. **Small Ruminant Research**, v. 98, p. 59-63, 2011.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B**, v. 910, p. 2-13, 2012.

Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, E. S. P. Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates, **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 35, p. 2923–2950, 2012.

IBGE (2015). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.sidra.ibge.gov.br> (acesso em 21.10.2016).

IVANOVIC, S.; NESIC, K.; PISINOV, B.; PAVILOVIC, I. The impact of diet on the quality of fresh meat and smoked ham in goat. **Small Ruminant Research**, v. 138, p. 53-59, 2016.

KURUKJI, D.; NORTON, I.; SPYROPOULOS, F. Fabrication of sub-micron protein-chitosan electrostatic complexes for encapsulation and pH-Modulated delivery of model hydrophilic active compounds. **Food Hydrocolloids**, 2015.

LANÇAS, F. M. Cromatografia líquida moderna:HPLC/CLAE. 1ª ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009.

LEARY, D. H.; HERVEY, W. J.; DESCHAMPS, J. R.; KUSTERBECK, A. W.; VORA, G. J. Which metaproteome? The impact of protein extraction bias on metaproteomic analyses. **Molecular and Cellular Probes**, v. 27, p. 193-199, 2013.

LEHNINGER, A. L. Princípios de bioquímica. 4 ed. São Paulo: SARVIER, 2006.

L. GUIST.; A. LUCACCHUNI. Proteomic studies of formalin-fixed paraffin-embedded tissues. **Expert Review of Proteomics**, v. 10, p. 165-177, 2013.

L'HOCINE, L.; PITRE, M. Quantitative and qualitative optimization of allergen extraction from peanut and selected tree nuts. Part 2. Optimization of buffer and ionic strength using a full factorial experimental design. **Food Chemistry**, v. 194, p. 820-827, 2016.

LOPES, L. S.; MARTINS, S. R.; CHIZZOTTI, M. L.; BUSATO, K. C.; OLIVEIRA, I. M.; MACHADO NETO, O. R.; PAULINO, P. V. R.; LANNA, D. P. D.; LADEIRA, M. M. Meat quality and fatty acid profile of Brazilian goats subjected to different nutritional treatments. **Meat Science**, v. 97, p. 602-608, 2014.

MADRUGA, M. S.; ARAÚJO, W. O.; SOUSA, W.H.; CEZAR, M. F.; GALVÃO, M. S.; CUNHA, M. G. G. Efeito do genótipo e do sexo sobre a composição química e o perfil de ácidos graxos da carne de cordeiros. **Rer. Bras. Zootec**, v. 35, p. 1838-1844, 2006.

MADRUGA, M. S.; BRESSAN, M. C. Goat meats: Description, rational use, certification, processing and technological developments. **Small Ruminant Research**, v. 98, p. 39-45, 2011.

MADRUGA, M. S.; NARAIN, N.; ARRUDA, S. G. B.; SOUZA, J. G.; COSTA, R. G.; BESERRA, F. J. Influência da idade de abate e da castração nas qualidades físicoquímicas, sensoriais e aromáticas da carne caprina. **Rer. Bras. Zootec.**, v. 31, n. 3, p. 1562-1570, 2002.

MADRUGA, M. S.; NARAIN, N.; DUARTE, T. F.; SOUSA, W. H.; GALVÃO, M. S.; CUNHA, M. G. G.; RAMOS, J. L. F. Características químicas e sensoriais de cortes comerciais de caprinos SRD e mestiços de Bôer. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n.4, p. 713-719, 2005.

MALAKI, N. A.; WRIGHT, A. J.; CORREDIG, M. Interfacial design of protein-stabilized emulsions for optimal delivery of nutrients. **Food & Function**, v. 1, p. 141–148, 2010.

MA, T.; WANG, Q.; WU, H. Optimization of extraction conditions for improving solubility of peanut protein concentrates by response surface methodology. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 1450-1455, 2010.

MICHALKE, B. The coupling of LC to ICP-MS in element speciation: I. General aspects. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n 2, p. 142-153, 2002.

MIZUBUTI, I. Y.; BIONDO JUNIOR, O.; SOUZA, L. W. O.; SILVA, R. S. S. F.; IDA, E. L. Response surface methodology for extraction optimization of pigeon pea protein. **Food Chemistry**, v. 70, p. 259-265, 2000.

MONTE, A. L. S.; GONSALVES, H. R. O.; VILLARROEL, A. B. S.; DAMACENO, M. N.; CAVALCANTE, A. B. D. Qualidade da carne de caprinos e ovinos: uma revisão. **Agropecuária científica no semiárido**, v. 8, n. 3, p. 11-17, 2012.

MULCAHY, E. M.; MULVIHILL, D. M.; O'MAHONY, J. A. Physicochemical properties of whey protein conjugated with starch hydrolysis products of different dextrose equivalent values. **International Dairy Journal**, v. 53, p. 20–28, 2016.

O'CONNELL, J. E., & FLYNN, C. The manufacture and application of casein-derived ingredients. **Handbook of Food Products Manufacturing**, v. 1, p. 557–593, 2007.

O'SULLIVAN, J. J.; KURUKJI, D.; NORTON, I. T.; SPYROPOULOS, F. Investigation of the fabrication and subsequent emulsifying capacity of potato protein isolate/ κ -carrageenan electrostatic complexes. **Food Hydrocolloids**, 2016.

PEREIRA, P. C. S.; FREITAS, C. F.; CHAVES, C. S.; ESTEVÃO, B. M.; PELLOSI, D. S.; TESSARO, A. L.; BATISTELA, V. R.; SCARMINIO, I. S.; CAETANO, W.; HIOKA, N. A quimiometria nos cursos de graduação em química: proposta do uso da análise multivariada na determinação de pka. **Química Nova**, v. 37, n. 8, p. 1417-1425, 2014.

PERREIRA FILHO, E. R. Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados. São Carlos: EdUFSCar, 2015.

PHONGTHAI, S.; LIM, S. T.; RAWDKUEN, S. Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. **Journal of Cereal Science**, v. 70, p. 146-154, 2016.

RESELLI, L.; CODREA, M. C.; SAVOINI, G.; CECILIANI, F.; BENDIXEN, E. LC-MS/MS analysis of visceral and subcutaneous adipose tissue proteomes in young goats with focus on innate immunity and inflammation related proteins. **Journal of Proteomics**, v. 108, p. 259-305, 2014.

RIGUEIRA, L. M. B.; LANA, D. A. P. D.; SANTOS, D. M.; PIMENTA A. M.; AUGUSTI, R.; COSTA, L. M. Identification of metal-binding to proteins in seed samples using RF-HPLC-UV, GFAAS and MALDI-TOF-MS. **Food Chemistry**, v. 211, p. 910-915, 2016.

SABOW, A. B.; SAZILI, A. Q.; ZULKIFLI, I.; GOH, Y. M.; KADIR, M. Z. A. A.; ABDULLA, N. R.; NAKYINSIGE, K.; KAKA, U.; ADEYEMI, K. D. A comparison of bleeding efficiency, microbiological quality and lipid oxidation in goats subjected to conscious halal slaughter and slaughter following minimal anesthesia. **Meat Science**, v. 104, p. 78-84, 2015.

SAREMIRADA, P.; WOODA, J. A.; ZHANG, Y.; RAY, A. K. Oxidative protein refolding on size exclusion chromatography at high loading concentrations: Fundamental studies and mathematical modeling. **Journal of Chromatography A**, v. 1370, p. 147-155, 2014.

SCHURE, M. R.; MORAN, R. E. Size exclusion chromatography with superficially porous particles. **Journal of Chromatography A**, v. 1480, p. 11-19, 2017.

SGARBIERI, V.C. Métodos de avaliação da qualidade nutricional dos alimentos. In: Alimentação e Nutrição - Fator de Saúde e Desenvolvimento. São Paulo, Almed, p. 250-261, 1987.

SPEDA, J.; JOHANSSON, M. A.; CARLSSON, U.; KARLSSON, M. Assessment of sample preparation methods for metaproteomics of extracellular proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 516, p. 23-36, 2017.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.; Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

TOMOVIC, V. M.; JOKANOVIC, M. R.; GAJIC, J. V. S.; VASILJEVIC, I. M.; SOJIC, B. V.; SKALJAC, S. B.; PIHLER, I. I.; SIMIN, V. B.; KRAJINOVIC, M. M.; ZUJOVIC, M. M. Physical characteristics and proximate and mineral composition of Saanen goat male kids meat from Vojvodina (Northern Serbia) as influenced by muscle. **Small Ruminant Research**, v. 145, p.44-52, 2016.

TRAN, M. Q. T.; NYGREN, Y.; LUNDIN, C.; NAREDI, P.; BJORN, E. Evaluation of cell lysis methods for platinum metallomic studies of human malignant cells. **Analytical Biochemistry**, v. 396, p. 76-82, 2010.

TURNER, K. E.; BELESKY, D. P.; CASSIDA, K. A.; ZERBY, H. N. Carcass merit and meat quality in Suffolk lambs, Katahdin lambs, and meat-goat kids finished on a grass-legume pasture with and without supplementation. **Meat Science**, v. 98, p. 211-219, 2014.

VOET, D.; JUDITH, V.; PRATT, C. W. Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

WALCZYK, N. E.; SMITH, P. M. C.; TOVEY, E. R.; ROBERTS, T. H. Peanut protein extraction conditions strongly influence yield of allergens Ara h 1 and 2 and sensitivity of immunoassays. **Food Chemistry**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.063>, 2016.

WALSTRA, P.; VLIET, T. V. Chapter II Functional properties. **Industrial Proteins in Perspective**, v. 23, p. 9-30, 2003.

WANI, A. A.; KAUR, D.; AHMED, I.; SOGI, D. S. Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 1514-1520, 2008.

WANI, A. A.; SOGI, D. S.; GROVER, L.; SAXENA, D. C. Effect of Temperature, Alkali Concentration, Mixing Time and Meal/Solvent Ratio on the Extraction of Watermelon

Seed Proteins-a Response Surface Approach. **Biosystems Engineering**, v. 94, p. 67-73, 2006.

WEBB, E. C.; O'NEILL, H. A. The animal fat paradox and meat quality. **Meat Science**, v. 80, p. 288-36, 2008.

XU, C. H.; CHEN, G. S.; XIONG, Z. H.; FAN, Y. X.; WANG, X. C.; LIU, Y. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 12-29, 2016.

ZAMORA P. P.; MORAIS, J. L. D.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 10, p. 106-110, 2005.

ZHAO, J.; ZHOU, T.; ZHANG, Y.; NI, Y.; LI, Q. Optimization of arachin extraction from defatted peanut (*Arachis hypogaea*) cakes and effects of ultra-high pressure (UHP) treatment on physiochemical properties of arachin. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 38-46, 2015.