

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E NUTRICIONAL *in vitro* DAS PROTEÍNAS DO SORO DE SANGUE BOVINO¹

Ana Silvia PRATA²; Valdemiro Carlos SGARBIERI^{2*}

RESUMO

O objetivo principal deste trabalho foi o isolamento e a caracterização química e nutricional (*in vitro*) das duas principais frações protéicas do soro de sangue bovino. Imediatamente, após coleta higiênica do sangue em matadouro, promoveu-se a coagulação e a remoção da fração celular por centrifugação, em condições apropriadas. A fração globulina (GB) foi precipitada do soro pela saturação a 50% com (NH₄)₂SO₄. Após separação da GB por centrifugação a saturação do sobrenadante foi elevada a 80%, para a precipitação da albumina (BSA). A precipitação de proteínas séricas das duas frações somou 98% das proteínas totais do soro. As duas frações protéicas foram caracterizadas quanto à composição centesimal, perfil de aminoácidos, composição mineral, escore de aminoácidos essenciais (EAE), digestibilidade da proteína e PDCAAS ("Protein digestibility corrected amino acid scoring"). O teor de proteína nas duas frações foi de aproximadamente 85% e a BSA se caracterizou pelo elevado teor de lisina, histidina e aminoácidos sulfurados. O EAE para BSA foi 70% sendo triptofano o aminoácido mais limitante e 87,8% para a GB, sendo a isoleucina o aminoácido mais limitante. O uso das técnicas de eletroforese e densitometria permitiu a caracterização das frações quanto ao número de bandas pesos moleculares e proporção relativa entre as várias proteínas.

Palavras-chave: proteínas séricas; albumina; globulina; fracionamento; valor nutritivo.

SUMMARY

OBTENTION, CHEMICAL AND NUTRITIONAL CHARACTERIZATION *in vitro* OF BOVINE SERUM PROTEINS. The main objective of this work, was the isolation, chemical and nutritional (*in vitro*) characterization of the two main protein fractions of bovine blood serum. Immediately after hygienic collection at the slaughter house the blood was coagulated and the cellular fraction separated by centrifugation under appropriate conditions. The globulin (GB) fraction was precipitated from blood serum by 50% saturation with ammonium sulfate. The supernatant was separated by centrifugation and the (NH₄)₂SO₄ saturation elevated to 80%. Under this condition BSA precipitated. Precipitation (recovery) of proteins amounted to 98% of total serum protein, in the two fractions. Both GB and BSA were characterized as to proximate percent composition, mineral, amino acid profiles, essential amino acid score (EAE), protein digestibility, and protein digestibility corrected amino acid scoring (PDCAAS). Protein concentration in both fractions was around 85%. BSA presented high concentrations of lysine, histidine and sulfur amino acids, particularly cystine. The EAE for BSA was 70%, tryptophan being the most limiting amino acid, and for GB the EAE score was 87.8% with isoleucine as the most limiting amino acid. PAGE-SDS and densitometry permitted the fractions characterization as the number of protein bands molecular weight and relative proportions among the various proteins.

Keywords: serum proteins; albumin; globulin; fractionation; nutritive value.

1 - INTRODUÇÃO

Na indústria alimentícia, a não utilização de subprodutos implica em desperdício de recursos e aumento de custos dos produtos comercializados. No setor de carnes esse custo pode ser maior em função do grande potencial poluente do sangue dos animais e da quantidade de sangue descartada por peso de carne gerada. Um bovino adulto produz em média 75Kg de sangue [21] onde 60% dos sólidos (30% do volume sangüíneo) são proteínas idênticas às da carne, de fácil extração e alta compatibilidade com o organismo o que reforça o interesse na utilização deste subproduto como fonte de proteínas.

Com exceção da hemoglobina, praticamente todas as proteínas do sangue são encontradas em sua porção

líquida, que pode ser obtida de duas maneiras: pela adição de um agente anticoagulante (plasma) ou pela retirada dos coágulos formados sob condição normal (soro). O soro apresenta vantagem sobre o plasma quando se deseja separar as proteínas, por não possuir o fibrinogênio, proteína eliminada com os coágulos.

A porção líquida possui 8% de sólidos dos quais 6,5% são proteínas tendo como principais frações as albuminas (42% p/v) e as globulinas (56% p/v) [17, 23] dos sólidos totais. As proteínas isoladas têm aplicações em sistemas específicos, como exemplo a BSA, importante por suas características funcionais tecnológicas e pelo provável efeito sobre o sistema imunológico, além de sua função como transportadora de alguns nutrientes.

Muitos métodos que estão disponíveis para fracionar proteínas têm sido discutidos por diversos autores [13, 16, 18, 22, 23]. Os métodos envolvem a precipitação por solventes orgânicos ou não, mas as frações obtidas não são de alta pureza e para muitas aplicações devem ser purificadas. A maior vantagem do uso do sulfato de amônio se deve à sua alta solubilidade (alta molaridade), o que causa a precipitação da maioria das proteínas, não ter alto

¹ Recebido para publicação em 09/03/2004. Aceito para publicação em 04/04/2005(001306).

² Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. End.: Rua Monteiro Lobato, 80. CEP: 13083-862, Campinas-SP. E-mail: sgarb@fea.unicamp.br.

* A quem a correspondência deve ser enviada.

calor de dissolução, prevenir ou limitar o crescimento bacteriano e proteger a maioria das proteínas da desnaturação [10]. Em relação a outros métodos de recuperação de proteínas do sangue, apresenta a vantagem adicional de não desnaturar as globulinas podendo-se obter a proteína intacta como fração adicional, no processo de remoção das albuminas. Apresenta a desvantagem da necessidade de técnicas de diálise ou ultrafiltração para a retirada do sal, mas frente a outras técnicas de fracionamento representa grande vantagem tecnológica [18, 19].

O objetivo principal deste trabalho foi o isolamento e a caracterização química e nutricional (*in vitro*) das duas principais frações protéicas do soro de sangue bovino.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material

O sangue foi coletado pela TECSORO Comercial Ltda., no frigorífico Gjota (Promissão-SP). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e de várias procedências. Para diálise da proteína precipitada foram utilizadas membranas D-9527 (Sigma).

2.2 - Métodos

2.2.1 - Obtenção das frações

● Separação da fração celular

O sangue foi coletado de animais sadios, imediatamente após o abate, através do uso de "faca vampiro" por punção direta da veia jugular (*Arcus aortae*) em recipientes de inox previamente escaldados em vapor, evitando o contato com fluidos do animal e mantido em sala climatizada a 20 °C por aproximadamente 1 hora, para que ocorresse a coagulação natural. Os coágulos foram retalhados e passados em filtros de tela grossa e o líquido filtrado foi centrifugado por 10 min a 9000g em uma centrífuga a disco (WESTFALIA, MTA-9). Após a separação, o soro (60% do sangue (v/v)) foi embalado em sacos de polietileno de 5Kg, submetido a um túnel de resfriamento rápido a -30 °C e armazenado em câmaras em temperatura constante de -25 °C.

● Isolamento das frações protéicas

As frações protéicas do soro foram obtidas pela precipitação seletiva com sulfato de amônio até os pontos de saturação de cada fração, 50 e 80%, respectivamente, para globulina e albumina [7]. Após a centrifugação, os precipitados foram ressuspensos em água e dialisados, para a eliminação do sal usado. Amostras foram liofilizadas em liofilizador de laboratório FTS SYSTEM.

O fluxograma de obtenção das duas frações protéicas (GB e BSA) está mostrado na *Figura 1*.

● Cálculo da recuperação da proteína

A eficiência do método de precipitação foi verificada através da recuperação da proteína calculada com base na determinação de proteína Kjeldhal ($N \times 6,25$).

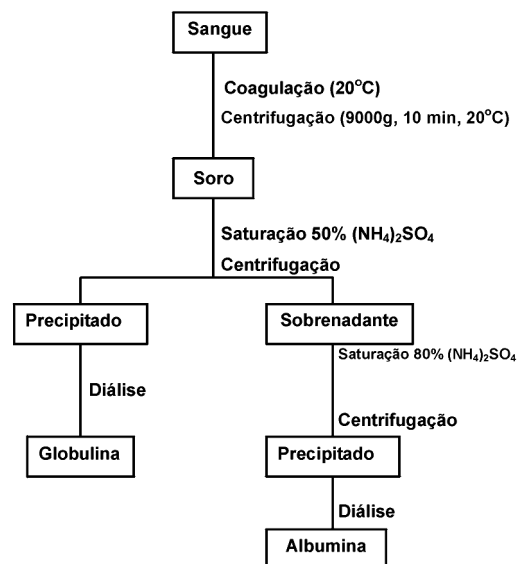


FIGURA 1 - Fluxograma da precipitação fracionada das proteínas do soro de sangue bovino com sulfato de amônio

$$\%RP = \frac{P_{g} + P_{a}}{PT_{soro}} \cdot 100$$

Em que %RP é o rendimento do processo (recuperação total) considerando as proteínas das frações globulinas (P_g) e albuminas (P_a) em relação à quantidade de proteína total analisada no soro (PT_{soro}). O rendimento em albuminas e globulinas foi calculado pela quantidade de proteína recuperada nas respectivas saturações em relação à proteína total do soro, sem considerar a pureza da amostra.

● Eletroforese

A eletroforese foi realizada segundo LAEMMLI [24] em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O sistema usado consistiu de um gel de gradiente 8-25% de acrilamida e foi realizado em equipamento Phastsystem da Pharmacia.

Amostras (1mg/mL proteína) foram dissolvidas em tampão Tris-HCL 6N, pH 6,8 contendo 4% p/v SDS, 5% v/v β-mercaptoetanol. Os géis foram corados em solução metanol-ácido acético-água (3:1:6 v/v/v) com 0.2% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 por duas horas a temperatura ambiente e descorados na mesma solução sem o corante por 4 horas. Fosforilase b (PM 94,000), BSA (PM 67,000), ovalbumina (PM 43,000), anidrase carbônica (PM 30,000), inibidor de tripsina (PM 20,000), α-lactalbumina (PM 14,400) foram usadas como padrões para estimar as faixas de pesos moleculares e identificar as bandas de proteínas, em cada fração isolada.

Para quantificação das bandas protéicas observadas na eletroforese, os géis foram analisados por densitome-

tria. Os padrões eletroforéticos foram analisados em densitômetro (Pharmacia Image master 1D Primer) e a quantidade relativa de proteína de cada banda foi calculada pela porcentagem da área no densitograma pela área total equivalente à quantidade de proteína inicial na análise.

2.2.2 - Caracterização química dos isolados protéicos

● Composição química centesimal

Lípidios totais foram determinados pelo método descrito por BLIGH & DYER [4], empregando-se os solventes clorofórmio, metanol e água (1:2:0.8) para extração dos lípidios. Nitrogênio total, cinzas, umidade como descrito no AOAC [3]. A proteína foi obtida usando o fator de conversão de nitrogênio total 6,25.

● Determinação de minerais

A maioria dos minerais (cálcio, fósforo, sódio, magnésio, zinco e cobre) foi determinada de acordo com ANGELUCCI & MANTOVANI [2] depois de uma mineralização das amostras em mufla a 450 °C e diluição em ácido nítrico 5%. Para análise de ferro, as amostras foram submetidas a processo de destruição da matéria orgânica por via úmida com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio até digestão completa, sendo então diluídas em ácido clorídrico 5% [25]. A quantificação dos minerais foi realizada em espectrômetro de emissão de plasma de argônio (ICP-2000 BAIRD), versão simultânea, frequência de 40MHz, potência de 1000W, nebulizador pneumático concêntrico e tocha de baixo fluxo. O fluxo de entrada das amostras foi de 3mL/min e do argônio de 15mL/min [15].

2.2.3 - Caracterização nutricional

● Composição em aminoácidos

As amostras foram hidrolisadas com HCl 6N em tubos de hidrólise, seladas a vácuo e mantidas a 110 °C por 22 horas. Após a incubação, o ácido clorídrico foi evaporado e após recuperação da amostra em tampão citrato pH 2,2, alíquota de 25µL foi injetada no analisador Dionex DX 300, para separação dos aminoácidos em coluna de troca catiônica e reação pós-coluna com ninidrina [26]. Solução padrão de aminoácidos Pierce foi utilizada como referência. O triptofano foi determinado segundo SPIES [27].

● Digestibilidade *in vitro*

A digestibilidade da proteína *in vitro* foi realizada conforme AKESON & STAHMANN [1]. Cerca de 250mg de proteína foram hidrolisados com pepsina e pancreatina a 37 °C em agitação contínua. A precipitação da proteína não hidrolisada foi feita pela adição de ácido tricloroacético (TCA) a 10% concentração final (p/v) e determinou-se o nitrogênio contido na fração solubilizada e filtrada. A caseína foi empregada como padrão de referência. A digestibilidade foi calculada como:

$$\text{Digestibilidade corrigida (\%)} = \frac{(Nd - Nb - Ne)}{Nt - Nb} \times 100$$

Em que: Nd= N digerido; Nb = N originalmente solúvel na amostra; Ne = N produzido pela autodigestão do sistema enzimático; Nt = N total da amostra, em mg.

Com os valores de composição de aminoácidos e digestibilidade, *in vitro*, estimaram-se: a) escore de aminoácidos essenciais (EAE), tomando-se como referência os aminoácidos do padrão da FAO/WHO [11], segundo HENLEY & KUSTER [14], onde EAE (%) = aminoácido mais limitante na proteína teste/ mesmo aminoácido no padrão de referência x 100; b) PDCAAS (%) = EAE (%) x digestibilidade (%).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Obtenção das frações

O método adotado mostrou uma recuperação total de proteínas de 98%, e em albuminas 71% (80% de saturação). TANAKA [28], reproduzindo o método 5 e 6 de COHN [7] com sangue bovino, mostrou que o método 6 apresentou uma recuperação média de 76,6% em albuminas, e o método 5 um rendimento menor, porém, nesses métodos há desperdício das demais proteínas em função da recuperação das albuminas, usadas para fins médicos; além do mais, o autor parte do plasma sendo que uma etapa de fracionamento é realizada para retirar o fibrinogênio da solução plasmática.

Na fração GB detectou-se três bandas, sendo duas com elevada quantidade de proteína, em 57.000Da (41,78%) e 67.000Da (46,81%), e uma, em 81.000Da com 11,41% da proteína total da fração. Este método possibilitou obter a BSA com 90,71% da proteína possuindo peso molecular de 65.000Da e os 9,29% restantes apareceram como uma banda de 96.000Da. O perfil eletroforético com as diferentes bandas de proteína e seus respectivos pesos moleculares não são mostrados neste artigo.

3.2 - Caracterização química

A composição centesimal das frações protéicas do soro do sangue bovino e do soro integral desidratados por liofilização está apresentado na *Tabela 1*. A porcentagem de carboidratos foi estimada por diferença com a somatória dos demais componentes.

TABELA 1 - Composição centesimal das frações e do soro de sangue liofilizadas

Componentes (%)	Albumina ^a	Globulina ^a	Soro integral ^a
Proteína	83,33 ± 0,03 ^a	85,36 ± 0,04 ^a	83,50 ± 0,32 ^a
Cinzas	0,42 ± 0,01 ^a	0,26 ± 0,05 ^c	0,35 ± 0,02 ^b
Umidade	7,46 ± 0,13 ^a	6,36 ± 0,21 ^b	6,71 ± 0,04 ^b
Lípidios	5,42 ± 0,05 ^a	1,7 ± 0,05 ^b	1,50 ± 0,32 ^b
Carboidrato	3,40	6,32	7,94

^a Média de três repetições analíticas ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre amostras (p < 0,05).

O soro integral e as frações protéicas liofilizadas não diferiram em relação à concentração de proteína.

A quantidade de cinzas das amostras refere-se principalmente ao teor de sais ligados às proteínas e pode estar relacionada com a efetividade da diálise ou com elementos minerais ligados à proteína. A fração BSA apresentou teores mais elevados de cinzas e lipídios. É bem conhecida a capacidade da BSA se ligar a minerais e lipídios e atuar como transportadora desses nutrientes [23].

Na *Tabela 2* encontram-se os teores de minerais (macro e microelementos) das frações e do soro de sangue integral e por meio dela observa-se que a BSA possui cálcio, zinco, manganês e ferro em quantidades superiores à GB e ao soro integral. A concentração mais elevada de cálcio, zinco e ferro na BSA reflete uma maior capacidade dessa proteína de ligar ions divalentes. O soro tem um bom potencial como fonte de sódio, fósforo e potássio, sendo que o valor do sódio excede o recomendado [20] em quase 10 vezes. A presença do ferro em concentração relativamente elevada indica que houve hemólise no processo de obtenção do soro.

TABELA 2 - Composição em minerais das frações protéicas do soro de sangue bovino e do soro integral

Minerais (mg/100g)	Soro integral	Albumina	Globulina	RDA* (mg/dia)
Cálcio	87,69 ± 0,66	132,80 ± 1,04	10,22 ± 0,35	800
Magnésio	22,04 ± 0,22	8,52 ± 0,30	1,94 ± 0,06	350
Sódio	3681 ± 64	44,86 ± 1,62	88,60 ± 4,27	400
Fósforo	94,50 ± 1,13	73,43 ± 0,69	24,33 ± 0,32	800
Potássio	222,47 ± 2,22	11,45 ± 0,63	6,08 ± 0,83	1600
Zinco	2,73 ± 0,06	5,13 ± 0,06	1,53 ± 0,14	15
Manganês	0,01 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,01 ± 0,00	2-5
Ferro	4,99 ± 0,06	10,46 ± 0,09	5,04 ± 0,05	10-15
Cobre	0,81 ± 0,02	0,39 ± 0,01	1,29 ± 0,04	1,5-3,0

* Média de três repetições analíticas ± estimativa de desvio padrão;

** Recommended Dietary Allowances RDA [20]. Homens, 25-50 anos.

3.3 - Estimativa do valor protéico (avaliação nutricional)

3.3.1 - Composição em aminoácidos

Na *Tabela 3*, os perfis de aminoácidos essenciais e semi-essenciais da BSA, GB e soro de sangue bovino integral liofilizados são comparados com o padrão da FAO/WHO [11] e com a composição do plasma citado na literatura [8]. As duas frações e o soro integral possuem a maioria dos aminoácidos essenciais em quantidades superiores ao recomendado pela FAO/WHO [11], sendo que o aminoácido mais limitante é a isoleucina na GB e no soro integral e o triptofano na BSA. A BSA possui uma quantidade de cistina muito superior à recomendada e em relação às outras amostras por causa da grande quantidade de ligações dissulfeto em sua estrutura terciária, ao que pode ser atribuído seu possível efeito imunológico, como geradora de precursores da síntese de glutatona [5].

Sabe-se que a proteína do sangue, como um todo, é

limitante em isoleucina por ter hemoglobinas em grande quantidade, cerca de 60%, e essas serem limitantes em isoleucina. O soro, apesar de ser destituído de células vermelhas, visualmente é notável que houve hemólise de células e a composição de microelementos, através do ferro, confirma que há hemoglobina presente.

Segundo GIANCOLA et al. [12] a albumina e as globulinas se caracterizam por possuírem baixo conteúdo de triptofano e de metionina e altos teores de cistina e de aminoácidos com cargas nas cadeias laterais como ácido aspártico, glutâmico, lisina e arginina. A *Tabela 3* mostra que a BSA possui alto teor de lisina, histidina e aminoácidos sulfurados, valores que superam em dobro o padrão de referência utilizado. A globulina, apesar de fornecer os aminoácidos essenciais acima da quantidade exigida, possui quase todos em valores inferiores ao do soro integral, sendo ligeiramente limitante em isoleucina.

TABELA 3 - Composição de aminoácidos das frações protéicas do soro de sangue bovino e do soro integral liofilizadas

Aminoácidos (g/100g de proteínas)	Albumina (BSA)	Globulina (GB)	Soro	Plasma ²	FAO ¹
Lisina	12,40	7,21	9,13	7,47	5,8
Treonina	5,80	6,71	6,56	6,60	3,4
Valina	5,86	6,47	6,40	6,73	3,5
Leucina	11,68	7,46	9,52	9,34	6,6
Isoleucina	2,45	2,46	2,55	3,35	2,8
Triptofano	0,77	1,89	1,40	1,18	1,1
Histidina	4,28	2,71	3,49	4,18	1,9
½ Cistina	5,06	2,56	3,64	1,68	
Metionina	1,02	1,01	1,19	0,86	
Sulf. totais	6,08	3,57	4,83	2,54	2,5
Tirosina	5,05	4,54	4,95	4,78	
Fenilalanina	6,70	4,24	5,39	5,16	
Arom. totais	11,75	8,78	10,34		6,3
EAE (%)	70 (Try)	87,8 (Ileu)	91,1 (Ileu)	100,0	

¹ Padrão teórico da FAO/WHO [11] (aminoácidos indispensáveis para crianças de 2 a 5 anos de idade), ² DUARTE [9]; aminoácido mais limitante.

TABELA 4 - Digestibilidade *in vitro* das frações protéicas (BSA e GB) em comparação com a caseína comercial

Proteína	Digestibilidade**	PDCAAS (%)
BSA	91,28 ± 8,99 ^a	80,0
GB	97,83 ± 3,52 ^a	90,0
Caseína [†]	99,00 ± 1,71 ^a	86,0

[†] Composição de aminoácidos em BORGES [6]. ** média ± desvio padrão de três determinações.

A digestibilidade da BSA e da GB liofilizadas estão mostradas na *Tabela 4*, em comparação com a caseína comercial.

As duas frações protéicas apresentaram boa digestibilidade *in vitro* e não mostraram diferença estatística ($p > 0,05$) com a caseína, proteína de referência. O PDCAAS foi calculado em relação ao aminoácido mais limitante das proteínas, a isoleucina, para a GB e o triptofano, para a BSA.

4 - CONCLUSÕES

O processo utilizado apresentou boa recuperação das frações protéicas com pequena quantidade de contaminantes. O fato de se ter partido do soro como matéria-prima e não do plasma eliminou alguns possíveis contaminantes e diminuiu uma etapa do processo. As frações obtidas possuem quase todos os aminoácidos essenciais em quantidade superior à recomendada pela FAO/WHO, sendo a BSA limitante em 13% de isoleucina e 27% em triptofano e a GB em 12% em isoleucina. A BSA possui alto teor de lisina, histidina e aminoácidos sulfurados, valores que superam em dobro o padrão utilizado. A GB, apesar de fornecer os aminoácidos essenciais acima das quantidades exigidas, apresentou quase todos os aminoácidos com valores inferiores ao do soro integral. Todas as proteínas apresentaram boa digestibilidade *in vitro* e não mostraram diferença estatística ($p > 0,05$) com a caseína. O PDCAAS foi calculado em relação ao aminoácido mais limitante das proteínas, a isoleucina nas duas frações. A BSA possui cálcio, zinco, manganês e ferro em quantidades superiores à GB e ao soro integral. A presença do ferro em concentração relativamente elevada indica que houve hemólise no processo de obtenção do soro e que parte da hemoglobina foi precipitada com 80% de concentração salina.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AKESON, W.R.; STAHMANN, M.A.A. Pepsin-pancreatin digest index of protein quality evaluation. **The Journal of Nutrition**, v. 83, n. 3, p. 257-261, 1964.
- [2] ANGELUCCI, E.; MANTOVANI, D.B.M. Minerais em alimentos: manual técnico. Campinas: ITAL/SBCTA, 1986. 131p.
- [3] AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**, 15 ed., Washigton, 1990. v. 1-2.
- [4] BLIGH, E.C.; DYER, W. J.A Rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Phyciology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- [5] BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey protein: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 14, 296-309, 1991.
- [6] BORGES, P.Z. **Avaliação nutricional de concentrados protéicos obtidos do leite bovino**. Campinas, 2000. 83p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- [7] COHN, E.J. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fraction of the protein and lipoprotein components of biological tissues and foods. **Journal of the American Chemical Society**, v. 68, parte 1, p. 459-475, 1946.
- [8] DAWSON, R.M.C.; ELLIOT, D.C.; ELLIOT, W.H.; JONES, K.M. **Biochemical Research**, New York: Oxford University Press, 2 ed, 1969, 654 p.
- [9] DUARTE, R.M.T. **Obtenção de frações protéicas do sangue bovino: composição, valor nutritivo e propriedades funcionais**. Campinas, 1997. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [10] ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques, in: **Methods in Enzymology**, v. 182, 1990.
- [11] FAO/WHO FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Protein Quality Evaluation. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation. Roma, 1990.
- [12] GIANCOLA, C.; DE SENA, C.; FESSAS, D.; GRAZIANO, G.; BARONE, G. DSC studies on BSA denaturation. Effects of ionic strenght and SDS concentration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 20, n. 1, p. 193-204, 1997.
- [13] GÓMEZ-JUAREZ, C.; CASTELLANOS, R.; PONCE-NOYOLA, T.; CALDERÓN, V.; FIGUEROA, J. Protein recovery from slaughterhouse wastes. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 2, p. 129-133, 1999.
- [14] HENLEY, E.C.; KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. **Food Technology**, v. 48, n. 4, p. 74-77, 1994.
- [15] IMO INDUSTRIES INC. Analytical Instruments Division. ICP 2000 BAIRD. Spectrometer user's guide. Bedford, 1990.
- [16] KUBOTA, N.; TATSUMOTO, N.; SANO, T. Recovery of serum proteins using cellulosic affinity membranes modified with tannic acid. **Carbohydrate Polymers**, 40, p. 107-113, 1999.
- [17] MOURE, F.; RENDUELES, M.; DIAZ, M. Coupling process for plasma protein fractionation using ethanol precipitation and ion exchange chromatography. **Meat Science**, v. 64, p. 391-398, 2003.
- [18] PORCELLI, M.C.; MARTINEZ, T.L.; EIRIS, A.A.; BURACHICK, M. Recoleccion higienica de sangre bovina. **Noticiteca**, v. 12, n. 72, p., 1982.
- [19] PRATA, A.S. **Proteínas do soro de sangue bovino: propriedades nutritivas e funcionais**. Dissertação de Mestrado. Campinas-SP, 2002, 147p. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [20] RDA Recommended Dietary Allowances. Subcommittee on the Tenth Edition of the RDAs, Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences. Washington: National Academy Press, 1989. 284p.
- [21] RENUNCIO, A.; HAMAD, A.J.S. Valorização do sangue coletado em pequenos abatedouros para consumo humano. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, jun, 1999.
- [22] RITO-PALOMARES, M.; DALE, C.; LYDDIAT, A. Genneric application of an aqueous two phase process for protein recovery from animal blood. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 655-673, 2000.
- [23] SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos propriedades degradações modificações. São Paulo: Varela, 1996, 517p.
- [24] LAEMMLI, U.K. Clevage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**, v. 227, 680-685, 1970.
- [25] SLAVIN, S.; PETERSON G.E.; LINDAHL, P.C. Determination of heavy metais in meats by absorption

- spectroscopy. **Atomic Absorption Newsletter**, v. 14, n. 3, p. 57-59, 1975.
- [26] SPACKMAN, D.H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**. v. 30, n. 7, p. 1190-1206, 1958.
- [27] SPIES, J.R. Colorimetric procedures for amino acids. **Methods in Enzymology**, v. 3, p. 468-471, 1957.
- [28] TANAKA, K. **Fracionamento do plasma bovino para isolamento da albumina e sua liofilização**. São Paulo, 1987. Dissertação (Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP.