

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ALTERNATIVAS PARA VALORIZAÇÃO DA CASCA DE OVO
COMO COMPLEMENTO ALIMENTAR
E EM IMPLANTES ÓSSEOS

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências
Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito final para obtenção do Grau de Mestre
em Ciência dos Alimentos.**

Orientador : Prof. Dr. Antonio José S. Hamad

MARCOS ANTONIO DAS NEVES
(Engenheiro de Alimentos)

Florianópolis
1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ALTERNATIVAS PARA VALORIZAÇÃO DA CASCA DE OVO
COMO COMPLEMENTO ALIMENTAR
E EM IMPLANTES ÓSSEOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador : Prof. Dr. Antonio José S. Hamad

MARCOS ANTONIO DAS NEVES
(Engenheiro de Alimentos)

Florianópolis
1998

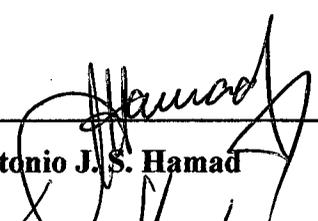
**ALTERNATIVAS PARA VALORIZAÇÃO DA CASCA DE OVO
COMO COMPLEMENTO ALIMENTAR
E EM IMPLANTES ÓSSEOS**

por

MARCOS ANTONIO DAS NEVES

**Dissertação aprovada como requisito final para
obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos
Alimentos, pela comissão formada por :**

Presidente:



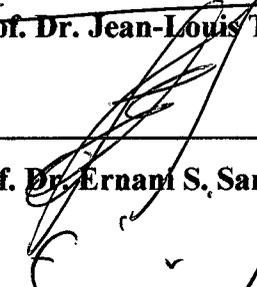
Prof. Dr. Antonio J. S. Hamad

Membro:



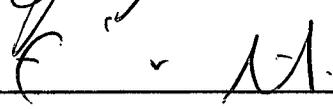
Prof. Dr. Jean-Louis Thapon

Membro :



Prof. Dr. Ernani S. Sant'Anna

Membro :



Prof.ª Dr.ª Edna R. Amante

Florianópolis, 16 de Setembro de 1998.

Aos “Mestres” que durante minha vida acadêmica souberam me incentivar:
meus professores primários, secundários e universitários e, dentre eles,
a uma pessoa em especial: Maria Aparecida das Neves, minha Mãe.

“... You can get it if you really want,
but you must try, try, try ...”

B.M.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir chegar onde cheguei e por acompanhar-me sempre, seja nos bons ou nos maus momentos.

À minha família, que sempre me apoiou, em todas as decisões de minha vida.

Ao Prof. Dr. Antonio J. S. Hamad, pela orientação e compreensão.

A todos os professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CAL), da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo apoio recebido durante o curso.

Aos colegas de curso, pela amizade e companhia tão agradável.

Aos servidores técnico-administrativos do CAL pela compreensão e colaboração.

À Escola Nacional Superior de Agronomia de Rennes e ao Prof. Dr. G. BRULE, Chefe do Departamento Agro-Alimentar, por receberem-me em suas instalações.

À equipe do Departamento Agro-Alimentar da ENSAR, pelo bom ambiente e humor. Foi um prazer fazer parte desta equipe durante estes meses.

Aos professores Dr. Antônio J. S. Hamad e Dr. Ernani Sant'Anna, do CAL, por proporcionarem-me a oportunidade de realizar o estágio em Rennes, França.

Ao Prof. Dr. J.L. THAPON por estar sempre disponível para qualquer auxílio técnico ou logístico, durante todo o período do estágio.

À Prof^ª. Dr^ª. C. GUERIN pela orientação durante o estágio; sem dúvida, enriqueci muito meu conhecimento técnico, graças aos seus conselhos e ensinamentos.

Ao Dr. L. DUPOIRIEUX, Centro Hospitalar Universitário de Angers, pela realização dos ensaios biológicos utilizando a casca de ovo.

Ao Prof. Dr. Y. NYS, INRA - Nouzilly, França, pelo apoio técnico e científico para a realização desta pesquisa.

À empresa Trois Vallées, Ambrières Les Vallées, França, por receber-me em suas instalações.

Ao Centro de Transferência de Tecnologia, Le Mans, França, por procederem os tratamentos de *plasma ashing* na casca de ovo.

Ao Laboratório de Tecnologia Leiteira, INRA – Rennes, e em especial ao Sr. M. PIOT por realizar a análise de amino ácidos na casca de ovo.

Ao Sr. Marcelo Boschi, em nome da empresa Sohovos, SP, pelo apoio recebido.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro, meu reconhecimento.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
TOMO I – VALORIZAÇÃO DA CASCA DE OVO COMO COMPLEMENTO OU SUPLEMENTO ALIMENTAR	5
1. INTRODUÇÃO	6
1.1. COMPONENTES DO OVO.....	6
1.1.1. Casca do ovo.....	7
1.2. COMPLEMENTOS ALIMENTARES.....	9
1.3. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS.....	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1. MATÉRIA-PRIMA.....	12
2.2. METODOLOGIA.....	12
2.2.1. Preparo da matéria-prima.....	12
2.2.2. Descrição do processamento.....	12
2.2.3. Composição centesimal da matéria-prima.....	14
2.2.4. Composição química da casca <i>in natura</i>	15
2.2.5. Estrutura microscópica da casca <i>in natura</i> e após tratamento ácido.....	15
2.2.6. Avaliação microbiológica.....	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1. RENDIMENTO DA REAÇÃO DA CASCA COM ÁCIDO.....	16
3.2. TESTE DE SOLUBILIDADE.....	16
3.3. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	17
3.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CASCA <i>IN NATURA</i>	18
3.5. ESTRUTURA MICROSCÓPICA DA CASCA <i>IN NATURA</i> E APÓS TRATAMENTO ÁCIDO.....	19
3.6. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	21
3.7. FATORES ECONÔMICOS	23
TOMO II – VALORIZAÇÃO DA CASCA DE OVO COMO SUBSTITUTO DE OSSOS	24
INTRODUÇÃO GERAL	25
CAPÍTULO I – PREPARO DE CASCAS COM TEOR REDUZIDO DE PROTEÍNAS PARA SER USADA COMO SUBSTITUTO DE OSSOS, EM IMPLANTES	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1. PREPARO DA CASCA PULVERIZADA.....	29
2.1.1. Teor de proteínas na casca pulverizada	29
2.2. PREPARO DE CASCA COM TEOR REDUZIDO DE PROTEÍNAS.....	29
2.2.1. Branqueamento com hipoclorito de sódio	29
2.2.2. Tratamento ácido.....	30
2.2.3. Tratamento alcalino.....	30
2.2.4. Tratamento de oxidação	30
2.2.5. Branqueamento associado com tratamento ácido.....	30
2.2.6. Branqueamento associado com tratamento alcalino.....	31

2.2.7. Aquecimento.....	31
2.2.8. Branqueamento associado com aquecimento	31
2.2.9. Aquecimento associado com branqueamento.....	31
2.2.10. Aquecimento associado com oxidação por H ₂ O ₂	31
2.2.11. Hidrólise enzimática.....	31
2.2.12. Hidrólise enzimática associada com branqueamento.....	32
2.2.13. Tratamento de oxidação por <i>plasma ashing</i>	32
2.2.14. <i>Plasma ashing</i> associado com branqueamento.....	32
2.3.DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS E REDUÇÃO DE PROTEÍNAS.....	33
2.4. TEOR DE PROTEÍNAS EM ALGUNS MATERIAIS UTILIZADOS PARA IMPLANTES EM OSSOS.....	33
2.5. DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA CASCA	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.1. TEOR DE PROTEÍNAS NA CASCA PULVERIZADA.....	34
3.2. REDUÇÃO NO TEOR DE PROTEÍNAS.....	34
3.2.1. Branqueamento com hipoclorito de sódio	34
3.2.2. Tratamento ácido.....	34
3.2.3. Tratamento alcalino.....	35
3.2.4. Tratamento de oxidação	35
3.2.5. Branqueamento associado com tratamento ácido.....	36
3.2.6. Branqueamento associado com tratamento alcalino.....	36
3.2.7. Aquecimento.....	36
3.2.8. Branqueamento associado com aquecimento	36
3.2.9. Aquecimento associado com branqueamento.....	37
3.2.10. Aquecimento associado com oxidação por H ₂ O ₂	37
3.2.11. Hidrólise enzimática.....	38
3.2.12. Hidrólise enzimática associada com branqueamento.....	38
3.2.13. Tratamento de oxidação por <i>plasma ashing</i>	38
3.2.14. <i>Plasma ashing</i> associado com branqueamento.....	39
3.3. Teor de proteínas EM ALGUNS MATERIAIS USADOS PARA IMPLANTES EM OSSOS.....	40
3.4. DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA CASCA	40
CAPÍTULO II – HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS MEMBRANAS DA CASCA.....	41
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAIS E MÉTODOS	44
2.1. PREPARO DA MEMBRANA.....	44
2.2.1. Teor de proteínas na membrana nativa.....	44
2.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA MEMBRANA.....	44
2.2.1. Hidrólise da membrana pela pepsina.....	44
2.2.2. Hidrólise da membrana pela flavourzima.....	45
2.2.3. Cinética da hidrólise (Densidade Ótica).....	45
2.3.CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA E DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE.....	46
2.3.1. Liofilização da membrana hidrolisada e do sobrenadante das soluções de hidrólise.....	46
2.3.2. Estudo de solubilização da membrana nativa.....	46
2.3.3. Caracterização da membrana nativa e dos produtos de	

hidrólise por eletroforese em gel de poli-acrilamida na presença de dodecilsulfonato de sódio (SDS-PAGE).....	47
2.3.4. Composição em aminoácidos da membrana nativa e dos produtos de hidrólise.....	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.1. TEOR DE PROTEÍNAS NA MEMBRANA NATIVA.....	51
3.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA MEMBRANA.....	51
3.2.1. Cinética da hidrólise da membrana pela pepsina.....	51
3.2.2. Hidrólise da membrana pela flavourzima.....	51
3.3. CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA E DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE.....	52
3.3.1. Estudo de solubilização da membrana nativa.....	52
3.3.2. Caracterização da membrana nativa e dos produtos de hidrólise por eletroforese em gel de poli-acrilamida na presença de dodecilsulfonato de sódio (SDS-PAGE).....	53
3.3.3. Composição em aminoácidos da membrana nativa e dos produtos de hidrólise.....	55
 <u>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</u>	56
 <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	59
 <u>ANEXOS</u>	68

LISTA DE TABELAS

1	Principais componentes dos ovos de galinha.....	6
2	Principais nutrientes dos ovos de galinha.....	6
3	Composição média da casca de ovo de galinha.....	7
4	Resultados da análise da composição centesimal da casca de ovo de galinha.....	17
5	Concentração de fósforo na casca de ovo e nas membranas da casca	18
6	Principais elementos químicos da casca de ovo, identificados por DRX.....	18
7	Resultados das análises de Coliformes Totais e Coliformes Fecais (NMP/g e <i>Salmonella spp</i> (UFC / 25 g) na casca de ovo de galinha	21
8	Padrões microbiológicos para ovos e produtos derivados.....	22
9	Composição do custo para obtenção de 1 kg de citrato de cálcio.....	23
10	Redução do teor de proteínas na casca tratada por branqueamento.....	34
11	Redução do teor de proteínas na casca tratada por oxidação com H ₂ O ₂	35
12	Redução do teor de proteínas na casca tratada por aquecimento.....	36
13	Redução do teor de proteínas na casca tratada por branqueamento e aquecimento..	37
14	Redução do teor de proteínas na casca tratada por aquecimento e branqueamento..	37
15	Redução do teor de proteínas na casca hidrolisada pela pepsina	38
16	Redução do teor de proteínas na casca tratada por <i>plasma ashing</i>	38
17	Redução do teor de proteínas na casca tratada por <i>plasma ashing</i> e branqueamento.	39
18	Comparação estatística entre os valores de redução no teor de proteínas	39
19	Teor de proteínas em alguns materiais usados para implantes em ossos	40
20	Composição em amino ácidos das membranas da casca de ovo.....	43
21	Proteínas usadas para calibração em eletroforese SDS-PAGE	48
22	Soluções de amostras preparadas para eletroforese SDS-PAGE	48
23	Solução de desnaturação para eletroforese SDS-PAGE	49
24	Solução tampão utilizada para eletroforese SDS-PAGE	49
25	Solução de coloração para eletroforese SDS-PAGE	50
26	Peso molecular das proteínas identificadas por eletroforese SDS-PAGE nas membranas da casca de ovo de galinha	54
27	Resultado da análise de amino ácidos nas membranas da casca	55

LISTA DE FIGURAS

1	Produção de ovos no Brasil (1980-1998).....	2
2	Ovos de mesa. Consumo <i>per capita</i>	3
3	Evolução do pH durante a reação entre soluções de ácido cítrico e a casca.....	17
4	Curva padrão para determinação de fósforo na casca de ovo.....	18
5	Microfotografia eletrônica de varredura da casca de ovo de galinha	19
6	Microfotografia eletrônica de varredura de um corte transversal da casca <i>in natura</i>	20
7	Microfotografia eletrônica de varredura da casca de ovo de galinha após tratamento com ácido cítrico 30 %.....	20
8	Microfotografia eletrônica de varredura da membrana da casca de ovo	21
9	Desenho esquemático da seção radial da casca de ovo.....	27
10	Distribuição granulométrica da casca micronizada.....	40
11	Estrutura hipotetizada das membranas da casca de ovo.....	42
12	Valores de DO durante a hidrólise da membrana pela pepsina (280 nm).....	51
13	Valores de DO durante a hidrólise da membrana pela flavourzima (280 nm).....	52
14	Perfil eletroforético SDS-PAGE (15 %) da membrana da casca de ovo.....	53
15	Curva de calibração com proteínas do kit de PM padrão.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA : Amino ácidos
- Ác. : Ácido
- ANOVA: Análise de Variância
- APA : Associação Paulista de Avicultura
- DDR : Dose Diária Recomendada (de um determinado nutriente)
- DO : Densidade ótica
- DRX : Difração de Raios X
- E / S : Enzima / substrato (peso / peso)
- FDA : *Food and Drug Administration* (órgão governamental dos EUA responsável pela administração de medicamentos e alimentos)
- g/min : Giros por minuto (velocidade centrífuga)
- MEV : Microscopia eletrônica de varredura
- m_f : massa final
- m_i : massa inicial (de um determinado composto)
- η : rendimento da reação
- NMP : Número Mais Provável (contagem de microorganismos)
- P_{atm} : à pressão atmosférica
- Plasma ashing*: técnica que faz uso do gás O_2 ionizado pela aplicação de energia de rádio frequência, formando um plasma altamente reativo; usada para oxidação do carbono.
- SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de Dodecilsulfonato de sódio
- TP : Teor de proteínas
- UBA : União Brasileira de Avicultura
- UFC : Unidades Formadoras de Colônia (contagem de microorganismos)
- USDA : *United States Department of Agriculture* (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)
- χ : Massa de um determinado sal que deveria ser formado ao final de uma reação, com um rendimento teórico de 100 %
- Σ : Somatório dos valores

RESUMO

Cascas de ovos brancos (espécie *Leghorn*) e vermelhos (Classe *Aves*), de galinha, foram estudadas com as seguintes finalidades: (a) determinar sua composição físico-química, microestrutura molecular e qualidade microbiológica; (b) estabelecer seu potencial para uso como complemento ou suplemento alimentar; (c) estabelecer seu potencial para uso como substituto de ossos, em implantes. Produziu-se, a partir da casca, sais de cálcio mais solúveis que o CaCO_3 (maior constituinte da casca de ovo), os quais podem ser usados como complemento ou suplemento alimentar. Estudou-se o rendimento das reações entre a casca e diferentes ácidos (acético, láctico e cítrico); o ácido que apresentou melhor resultado foi o ácido cítrico, produzindo-se então o citrato de cálcio, usado atualmente como complemento alimentar. Fez-se a caracterização das cascas, analisando-se sua composição centesimal, teor de P, composição química através de Difração de Raio X, estrutura microscópica através de microscopia eletrônica de varredura e qualidade microbiológica (Coliformes Totais e Fecais e *Salmonella spp*). Na segunda parte do trabalho fez-se a purificação dos minerais presentes na casca (basicamente cálcio) a fim de serem usados como substitutos de ossos, em implantes; fez-se a redução do teor de proteínas da casca usando-se diferentes tratamentos (soluções de NaClO , HCl , NaOH , H_2O_2 , *plasma ashing* e hidrólise enzimática), sendo que o que apresentou melhor resultado foi a hidrólise enzimática seguida por branqueamento. Fez-se após, um estudo das proteínas presentes nas membranas da casca, através de eletroforese em gel de poli-acrilamida em presença de dodecilsulfonato de sódio (SDS - PAGE), para serem usadas em implantes ósseos.

Palavras-chave: casca de ovo, complemento alimentar, substituto de ossos.

ABSTRACT

Chicken egg shells brown (Class *Aves*) and white (*Leghorn*) were studied aiming: to determinate it's physical-chemistry composition, molecular structure and microbiologic quality; to establish it's potential for using as food complement or supplement; to establish its' potential for using as a bone substitute, for grafts. Calcium salts were produced launching from egg shell; these salts are more soluble than CaCO_3 (major mineral constituent of egg shell) and can be used as food complement or supplement. The efficiency of reactions between egg shells and different acids (acetic, lactic and citric) was studied; the best results were obtained when using the citric acid, originating so calcium citrate, used actually as food complement. The characterization of egg shells was carried out analyzing the proximal composition, P content, chemical composition by X-Ray Diffraction, microscopic structure by scanning electronic microscopy and microbiologic quality (Total and Fecal Coliforms and *Salmonella spp*). The purification of minerals presents on egg shell (mainly calcium) was made up at the second part of this research, aiming to use these minerals as bone substitute, for grafts. The protein content of egg shells was reduced through different treatments (NaClO , HCl , NaOH and H_2O_2 solutions, plasma ashing and enzymatic hydrolysis); the enzymatic hydrolysis followed by bleaching showed the best results of protein reduction. The proteins present in egg shell membranes were identified by polyacrylamide gel electrophoresis in presence of sodium dodecylsulphate (SDS-PAGE), for using then in bone grafts.

Key-words: egg shell, food complement, bone substitute

INTRODUÇÃO GERAL

O fornecimento de nutrientes para a humanidade é um desafio constante; a fome é uma problemática presente, principalmente nos países em desenvolvimento, onde o aumento da população nem sempre é acompanhado por aportes alimentícios (Silva e Mellado, 1996).

A deficiência protéica na alimentação humana é evidente já nos dias de hoje e cresce à medida que se configura a evolução da população; no contexto agropecuário, que é um dos principais campos no combate a esta crise, a avicultura surge como uma das atividades mais promissoras devido às próprias características da exploração (Vicenzi, 1996).

Desde os tempos remotos, o ovo tem sido considerado uma importante fonte protéica em nossa dieta mas, por meados deste século, surgiu a problemática dos elevados níveis de colesterol, presente na gema. Considerando-se este fato, a ciência vem estudando a fundo não só os males que o ovo possa provocar como também suas propriedades terapêuticas; como resultado, atualmente o ovo já é usado na prevenção de algumas doenças, tais como câncer, hipertensão arterial e outras (López e Nomura, 1996).

O ovo integral é um excelente alimento, porque é uma fonte muito rica em proteínas, lipídios, vitaminas (com exceção do ácido ascórbico ou vitamina C), e sais minerais, exceto o cálcio, que é encontrado apenas na casca (Thapon *et* Bourgeois, 1994).

Segundo levantamento da União Brasileira de Avicultura (UBA) e Associação Paulista de Avicultura (APA), a produção de ovos no país em 1995 foi de 16,056 bilhões de unidades, entre ovos brancos e vermelhos, conforme Figura 1, o que representa um crescimento de 19 % em relação a 1994.

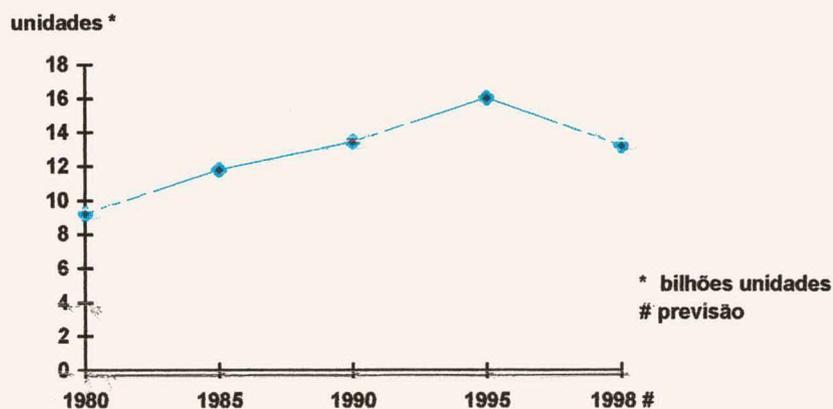


FIGURA 1 - Produção de ovos no Brasil (1980-1998)

Fonte: UBA / APA

Embora a produção de ovos em 1995 tenha alcançado um volume jamais visto no país, o mesmo não pôde ser observado em relação ao consumo. Segundo previsões feitas pela UBA / Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) / APA, o consumo *per capita* no Brasil, no ano de 1995, atingiu 101 unidades, enquanto que no Japão esta previsão foi de 260 unidades, no mesmo período (Figura 2), o que induz a acreditar que o potencial nacional é de pelo menos dobrar o consumo (Okuda, 1996).

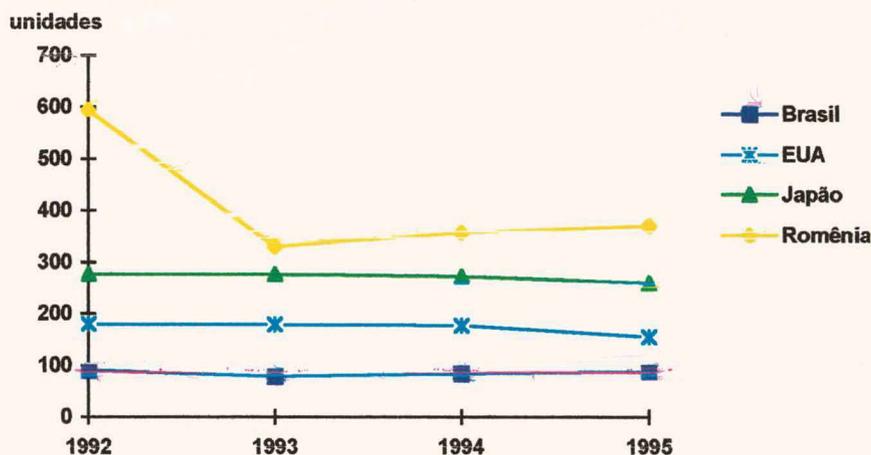


FIGURA 2 - Ovos de mesa. Consumo *per capita*.

Fonte: USDA (Okuda, 1996)

Sendo que a casca representa 10 % do peso do ovo, o volume de casca gerado é muito grande (considerando-se que um ovo grande pesa, em média 60 g, e que cerca de 10 % deste peso é constituído por casca, os 16,056 bilhões de ovos produzidos em 1996 representam 96.336 toneladas de casca). A empresa Sohovos, estabelecida em Piracicaba, SP, é líder no mercado de industrialização de ovos no Brasil, produz cerca de 180 toneladas de cascas por mês, as quais são destinadas basicamente à agricultura, para a correção do pH em solos ácidos (comunicação verbal).

A utilização da casca de ovo na alimentação humana aumenta o seu valor agregado; sendo a casca uma fonte rica em sais minerais (cerca de 95 % da sua composição), produtos suplementados com este mineral podem ser utilizados em dietas especiais para pessoas com deficiências na formação de sua matriz óssea (osteoporose, osteomalacia, osteíte) (Baker *et al.* 1991), raquitismo e outras doenças que afetam tanto idosos como crianças (Arruda, 1995).

Inúmeras preparações à base de cálcio e alimentos enriquecidos com cálcio, têm surgido no mercado nos últimos anos, para suprir uma dieta insuficiente e chegar-se a dose diária recomendada, no entanto, pouca atenção tem sido dada ao estudo da disponibilidade biológica do cálcio proveniente de diferentes fontes (Tsugawa, *et al.*, 1995).

Nos EUA a dose diária recomendada (DDR) pelo *Food and Drugs Administration* é de 800 mg de cálcio, e no Japão a DDR é de 600 mg para adultos (Tsugawa *et al.*, 1995).

Visando-se estudar o potencial tecnológico da casca de ovo de galinha com aplicação em diferentes nichos de mercado, desenvolveu-se este trabalho; devido a esta aplicação dar-se em campos de conhecimentos diferentes, e à utilização de metodologias ambíguas na obtenção dos produtos, dividiu-se o trabalho em duas etapas.

No TOMO I o objetivo foi a obtenção de sais de cálcio solúveis, a partir de cascas de ovos tratadas com diferentes ácidos; estes sais podem ser usados na indústria de alimentos como complemento ou suplemento alimentar. Estudou-se a casca de ovo, visando-se determinar sua composição físico-química, estrutura microscópica e qualidade microbiológica.

No TOMO II o objetivo foi a obtenção de produtos-base para serem usados em implantes ósseos, a partir da casca de ovo; para este fim, deve-se eliminar as proteínas presentes na casca, evitando-se assim possíveis reações de rejeição pelo membro implantado. Investigou-se a composição em termos de amino ácidos e as proteínas presentes nas membranas da casca; considerando-se que é sobre estas membranas onde se formam os primeiros núcleos de cristalização da casca, algumas destas proteínas podem ter a capacidade de induzir à mineralização do cálcio.

TOMO I

**VALORIZAÇÃO DA CASCA DE OVO
COMO COMPLEMENTO OU SUPLEMENTO ALIMENTAR**

1. INTRODUÇÃO

1.1. COMPONENTES DO OVO

O peso médio de um ovo de galinha é 55-65 g, o qual pode variar de acordo com a espécie e o tempo decorrido após a postura do ovo. Este peso pode ser distribuído entre quatro componentes principais (Tabela 1).

TABELA 1 - Principais componentes dos ovos de galinha

Componente	Peso ^a (g)	% do total ^a
Clara	37	61.5
Gema	17.3	29.0
Casca	5.5	9.1
Membranas	0.25	0.4
Total	60	100

Fonte: Thapon *et* Bourgeois (1994)

^a Valor médio

De acordo com Cheftel (1989), o ovo inteiro contém entre 6 a 8 g de proteína de alta qualidade e entre 5 a 7 g de gordura, das quais menos de 2 g são insaturadas. Além destes nutrientes, apresenta quantidades consideráveis de vitaminas e sais minerais; tem um pH em torno de 7.0 a 7.6 e apresenta uma composição característica (Tabela 2).

TABELA 2 - Principais nutrientes dos ovos de galinha

Nutriente	Composição ^a (%)
Água	65
Proteínas	12
Lipídios	11
Carboidratos	1
Minerais	11

Fonte: Cheftel (1989)

^a Valor médio

1.1.1. Casca do ovo

A casca do ovo é composta por várias camadas porosas, de modo que são permeáveis à água, e aos gases, o que permite a respiração do embrião (Tinoco, 1983).

Conforme Thapon *et Bourgeois* (1994) e Brake *et al.* (1997), a casca constitui uma barreira protetora, inclusive contra a penetração de microrganismos; sua parte externa é composta por uma micro película protéica (denominada cutícula), pouco solúvel em água, de espessura compreendida entre 10 a 30 μm . A camada calcária subjacente é composta por uma rede de fibras protéicas, entre as quais se inserem cristais de carbonato de cálcio (96 % do peso da casca); carbonato de magnésio (1 %) e fosfato de cálcio (1 %).

A casca apresenta, em média, a composição apresentada na Tabela 3.

TABELA 3 - Composição média da casca do ovo de galinha

Constituinte	Composição ^a (%)
Minerais	96
Proteínas	3
Água	1

Fonte: Thapon *et Bourgeois* (1994)

^a Valor médio

Burley & Vadehra (1989) afirmam que a casca possui ainda duas membranas internas, constituídas por uma mistura de proteínas e glicoproteínas, intimamente ligadas à casca, exceto em uma das suas extremidades, onde elas separam-se para formar a câmara de ar.

Segundo Simons (1971), a cutícula é depositada sobre a casca do ovo, durante sua formação; é composta por cerca de 90% de proteínas, carboidratos e pequenas quantidades de lipídios; desidrata-se logo após o ovo ser posto, tornando-se uma barreira contra a invasão de microrganismos e perda de água.

A cor da casca dos ovos depende de pigmentos presentes na alimentação ministrada às galinhas e da raça destas; os ovos da raça *Leghorn* são de casca nitidamente branca, enquanto que os das outras raças são de tonalidades marrom avermelhadas; não existe diferença na qualidade, valor nutricional, características de cozimento ou espessura da casca, entre os ovos de casca branca ou vermelha (López e Nomura, 1996).

Nys (1990) afirma que o cálcio da casca provém do cálcio iônico presente no sangue da galinha; cerca de 60 % do carbonato é produzido a partir do gás carbônico sangüíneo, baseando-se na reação:



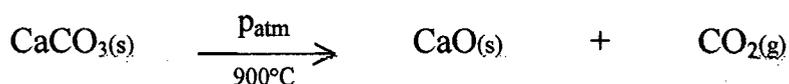
Em casos de carência de cálcio na alimentação, a galinha é capaz de absorver até 58% do cálcio do seu esqueleto; a necessidade diária de cálcio por uma galinha é de cerca de 2,2 g, a fim de que possa botar ovos de bom tamanho e com a casca resistente (Vicenzi, 1996), sendo que Roland, Bryant & Rabon (1996) apresentam um limite diário de cálcio na dieta de 3,85 %.

O carbonato de cálcio, maior constituinte da casca, é um cristal amorfo que ocorre naturalmente na forma de calcita (cristais hexagonais); apresenta uma baixa solubilidade: 1 litro de água à 18°C dissolve 13 mg de calcita. Os cristais de calcita ocorrem naturalmente em rochas calcárias, ossos, cascas de ovos; nas conchas de corais encontram-se cristais na forma de aragonita (Durrant, 1964).

Pode-se sintetizar o carbonato de cálcio em laboratório, na forma de um fino precipitado pela adição de uma solução de carbonato de amônio e amônia a uma solução de nitrato de cálcio, o qual tem sido purificado por recristalização. O pó obtido é amplamente utilizado na indústria cosmética; é branco, microcristalino, inodoro e insípido; dissolve-se no ácido carbônico e nos ácidos orgânicos mais fortes, assim como em ácidos minerais diluídos (Bonadeo, 1963).

Uma outra forma obter-se o carbonato de cálcio é precipitá-lo na forma de sal cálcico, à partir do ácido carbônico; o produto assim obtido é um pó insolúvel usado em cosmetologia, como tópicos, sendo um bom absorvente de líquidos e gorduras (Fonseca & Prista, 1984).

De acordo com Shreve & Brink Jr. (1980), pelo aquecimento do carbonato de cálcio (proveniente principalmente de depósitos calcários, mármore, greda ou de cascas de ostras), pode-se obter o óxido de cálcio, matéria-prima básica na indústria química, para a produção de cal. A reação de calcinação (queima), comercialmente realizada em alto forno por volta de 900°C, é descrita abaixo:



1.2. COMPLEMENTOS ALIMENTARES

Historicamente o uso de complementos e suplementos alimentares tem sido estudado e utilizado como uma eficiente técnica no controle de doenças, na área de saúde pública, tais como beri-beri, anemia e outras. Substâncias bionutricionais específicas - vitaminas, minerais, amino ácidos - podem ajudar a prevenir doenças crônicas e melhorar a qualidade de vida (Sloan & Stiedemann, 1996).

Uma destas substâncias é o cálcio, sendo este o mineral mais abundante em nosso corpo e o principal constituinte dos ossos e dentes. A ingesta inadequada de cálcio está associada com algumas doenças, como a osteoporose, o que tem levado ao desenvolvimento de um grande número de produtos enriquecidos com este mineral, nos últimos anos (Baker *et al.*, 1991).

Segundo Labin-Goldscher & Edelstein (1996), o corpo humano é totalmente dependente de um suprimento externo de cálcio, seja ele nutricional ou suplementar, visto que este não é capaz de produzir minerais; atualmente tem sido incrementado o uso de alimentos processados enriquecidos, suprimindo assim grande parte da necessidade fisiológica de sais minerais.

A biodisponibilidade de cálcio, proveniente de diferentes fontes, tem sido objetivo de pesquisas há vários anos, em humanos e animais, e existe uma considerável controvérsia relacionada à solubilidade e biodisponibilidade destes sais; esta solubilidade é incerta, mesmo nas condições extremamente ácidas do estômago entretanto, supõe-se que os sais de cálcio altamente solúveis sejam melhor absorvidos (Tsugawa *et al.*, 1995).

Fujita *et al.* (1996) estudaram a biodisponibilidade do cálcio proveniente de cascas de ostras aquecidas à 900°C comparando-o com CaCO_3 puro, e concluíram que o primeiro apresentou uma biodisponibilidade superior àquela do sal puro.

Atualmente são encontrados no mercado diferentes sais de cálcio para a suplementação de alimentos, tais como carbonato, fosfato, citrato, lactato e gluconato de cálcio; para optar por um destes sais, deve ser considerada sua biodisponibilidade e solubilidade (Arruda, 1995).

De acordo com Tsugawa *et al.* (1995), o carbonato de cálcio é um dos sais de cálcio mais amplamente usados na suplementação alimentar, principalmente devido ao alto teor de cálcio presente por unidade de peso do sal.

A maior fonte de cálcio na dieta humana é o fosfato de cálcio; o maior problema na determinação de um padrão nutricional deste mineral é a insolubilidade da maioria dos seus sais; pode-se relacionar as três formas deste fosfato em ordem crescente de solubilidade, como a seguir:



Arruda (1995), Keshavarz (1996) e Vicenzi (1996), afirmam que a suplementação da dieta com vitaminas, como colecalciferol (vit. D₃) e ácido ascórbico (vit. C), estimula a absorção do cálcio e do fósforo pelo rim, devido à ação dos metabólitos destas vitaminas, que atuam como hormônios; a vitamina D₃ só apresenta esta atividade após ser transformada na sua forma aproveitável 1-25-(OH)₂D₃ (Dihidroxi-colecalciferol), que regula inúmeras reações de metabolismo do cálcio e do fósforo e, em consequência, da qualidade da casca do ovo.

De acordo com Dawson-Hughes (1990), a necessidade de suplementação mínima para ter-se um efeito positivo, é de cerca de 1000 mg.

Por outro lado, a ingestão excessiva de cálcio na dieta humana está associada com algumas doenças, tais como o depósito de cálculos renais, em pessoas que apresentam uma baixa absorção de sais de cálcio pelo organismo ou, deficiências vitamínicas como baixas concentrações de colecalciferol (D₃).

1.3. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

Conforme Rodrigues (1995), as intoxicações alimentares causadas por salmonelas provenientes da contaminação de ovos têm sido um problema para a saúde pública, bem como despertado grande preocupação no consumidor e, sem dúvida alguma, nos próprios avicultores; um ovo pode estar contaminado com esta bactéria, sem que apresente qualquer diferença na sua aparência ou odor de um ovo não contaminado.

No início da década de 90 tinha-se a estatística de que, aproximadamente, 1 ovo em cada 10.000 ovos produzidos, estava contaminado com *Salmonella enteritidis*; atualmente afirma-se que esta relação seja ainda maior mas, não existe nenhum estudo científico que comprove este aumento (Puzo, 1995).

Segundo Blumenthal (1990), os sintomas da intoxicação por *Salmonella enteritidis* geralmente incluem febre, diarreia, vômito, dores abdominais, e cefaléia; desenvolvem-se a partir de 12 a 36 horas após a ingestão do alimento contaminado, podendo persistir por até 4 a 7 dias, e a maior parte das pessoas contaminadas recuperam-se sem o tratamento com

antibióticos; no entanto, a diarreia pode ser forte o suficiente para causar a hospitalização, mesmo em pessoas saudáveis; em casos mais graves, a bactéria pode se espalhar do trato intestinal para a corrente sanguínea, e daí para outros órgãos, podendo causar a morte do paciente, a menos que a pessoa seja imediatamente tratada com antibióticos.

São mais vulneráveis à contaminação por salmonelas os recém-nascidos e crianças, os idosos, mulheres grávidas, pessoas que já tenham seu sistema imunológico debilitado por doenças graves, como por exemplo AIDS, pessoas desnutridas e outras (Gast, 1997).

A bactéria *Salmonella enteritidis* pode sobreviver em águas, fezes, sangue ou em outros animais, como ratos, que levam os microrganismos à granja; estes crescem rapidamente, podendo contaminar inúmeros ovos limpos, quando misturados com um ovo contaminado (APHA, 1992).

Além da contaminação de ovos por salmonelas (o microrganismo com maior incidência na indústria avícola), alguns autores têm estudado a presença de outros patógenos, tais como *Escherichia coli* O157:H7 (Stanley *et al.*, 1996), *Listeria monocytogenes* e *Aeromonas hydrophila* (Sheldon & Schuman, 1997) e outros.

A contaminação de ovos por microrganismos pode ocorrer de duas formas: interna ou externa, no próprio meio ambiente; quando a contaminação é de origem interna, esta contaminação ocorre no próprio organismo, infectando o ovário de galinhas aparentemente saudáveis e contaminando os ovos, antes que a casca seja formada; quando não ocorre a contaminação interna, o ovo recém-posto normalmente não apresenta microrganismos; esta contaminação pode ocorrer pelo contato da casca com fezes nos ninhos, caixas de postura, equipamentos contaminados ou pelo próprio manuseio do ser humano (Rodrigues, 1995).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATÉRIA PRIMA

A matéria-prima utilizada foi cascas de ovos de galinha (brancos e vermelhos), cedidas pelo comércio local (padarias, confeitarias) da cidade de Florianópolis - SC.

2.2. METODOLOGIA

Apresenta-se o fluxograma de valorização da casca para uso como complemento alimentar no Anexo 1.

2.2.1. Preparo da Matéria Prima

a) Seleção: descartou-se cascas com excesso de sujidade ou depósito de matéria orgânica.

b) Lavagem: as cascas foram lavadas manualmente em água destilada e o resíduo de claras aderido às membranas foi separado.

c) Secagem: foram secas à 60°C, em estufa com circulação forçada de ar FABBE, durante 60 minutos.

d) Moagem: após secagem, as cascas foram moídas, com o auxílio de um moinho de martelo TECNAL.

e) Peneiramento: o pó obtido foi passado através de um conjunto de peneiras ($\phi = 1000, 800$ e $500 \mu\text{m}$), para a separação das duas frações visivelmente obtidas: minerais (formando um pó fino), e a membrana (na forma de pequenas escamas), sendo que a membrana ficou retida na peneira de $800 \mu\text{m}$ e o pó da casca passou por esta; o conjunto de peneiras foi agitado com o auxílio de um agitador Ro-tap, durante dez minutos.

f) Pesagem: utilizou-se em cada experimento 50 g do pó de cascas peneirado, as quais foram submetidas ao tratamento com diferentes ácidos a diferentes concentrações, tendo-se 9 soluções de tratamento diferentes.

2.2.2. Descrição do processamento

a) Tratamento ácido: as nove porções de casca preparadas previamente foram tratadas com soluções de ácido cítrico, ácido acético e ácido láctico, nas concentrações de 10, 20 e 30 %; em todos os casos usou-se 100 ml de solução para 50 g de amostra.

As cascas ficaram submersas nestas soluções durante 12 horas, sob agitação constante com o auxílio de um agitador magnético QUIMIS.

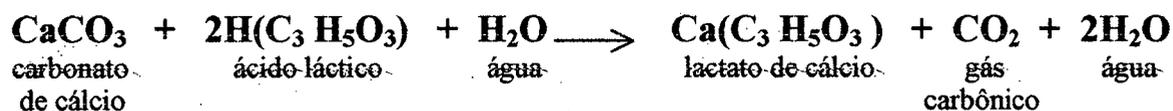
b) Lavagem e purificação : após o tratamento com os diferentes ácidos, os sais obtidos foram lavados com 50 ml de álcool etílico por várias vezes, renovando-se a solução de lavagem até que o pH do sobrenadante estivesse próximo à neutralidade, após centrifugação à 5.000 g durante 5 minutos; usou-se álcool etílico para esta lavagem devido à baixa solubilidade dos sais obtidos neste reagente; por exemplo, o citrato de cálcio apresenta uma solubilidade de 0,0065 g / 100ml de álcool e o lactato de cálcio é insolúvel em álcool etílico (Weast, 1980)

c) Secagem: todos os produtos foram secos à 60°C, em estufa com circulação forçada de ar FABBE, durante 30 minutos.

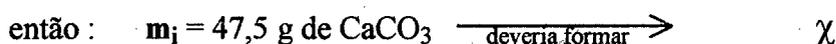
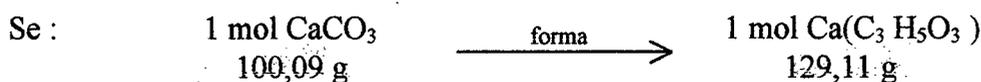
d) Pesagem: pesou-se os sais obtidos para calcular o rendimento de cada tratamento.

e) Cálculo do rendimento da reação : para o cálculo do rendimento da reação (em termos do sal obtido), deve-se considerar o peso molecular (PM) de cada sal, a massa inicial de carbonato (m_i) e a massa final obtida (m_f).

No caso do tratamento da casca com o ácido láctico a reação principal que deve ocorrer é a seguinte :



Baseando-se no fato de que cerca de 95 % da casca constitui-se por CaCO_3 (Thapon *et* Bourgeois, 1994), como partiu-se de 50 g de casca, tinha-se inicialmente aproximadamente $m_i = 47,5$ g de CaCO_3 em cada experimento.



$$\chi = 61,27 \text{ g Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)$$

O rendimento da reação (η) é calculado pela seguinte equação :

$$\eta = \frac{m_f}{61,27}$$

Determinou-se qual a melhor concentração e o melhor ácido para o tratamento da casca, conforme o rendimento da reação e as características reológicas dos nove produtos obtidos. Posteriormente, foi feito novo tratamento da casca, para obter-se o produto base para suplementação alimentar.

f) Teste de solubilidade: acompanhou-se a reação entre o ácido que apresentou o melhor rendimento e a casca, através de medidas do pH do sobrenadante da mistura. Partiu-se de 50 ml de cada solução ácida (10, 20 e 30 %); mediu-se o pH inicial das soluções, adicionou-se quantidades conhecidas de casca sob agitação constante com o auxílio de um agitador magnético QUIMIS, durante 60 minutos; deixou-se repousar durante 10 minutos e tomou-se uma alíquota do sobrenadante para a leitura do pH, e assim sucessivamente, até que as soluções estivessem saturadas (o sal de cálcio precipitou).

g) Identificação do sal de cálcio obtido: foi feita uma análise qualitativa no produto obtido para certificar-se de sua composição (acetato, lactato ou citrato de cálcio, conforme o ácido que apresentou o melhor rendimento); usou-se metodologia oficial para identificação de íons acetato, lactato ou citrato.

No caso do íon citrato adiciona-se, a 15 ml de piridina, alguns mg da amostra dissolvida ou suspensa em 1 ml de água destilada; agita-se e adiciona-se 5 ml de anidrido acético à mistura; deve aparecer uma coloração vermelha, após agitação (AOAC, 1992).

2.2.3. Composição centesimal da matéria-prima

Foi determinada a composição em termos de nutrientes presentes na casca de ovo, conforme metodologia oficial.

a) Umidade : determinou-se a umidade da casca por pesagem direta da amostra inicial e do resíduo, após aquecimento em estufa à 105°C até peso constante (AOAC, 1992).

b) Proteínas : O teor de proteínas foi analisado seguindo-se o método oficial Kjeldahl (AOAC, 1992).

c) Lipídios : O teor de lipídios foi analisado seguindo-se o método oficial Soxhlet (AOAC, 1992).

d) Carboidratos : determinou-se o teor de carboidratos totais disponíveis na casca por colorimetria (Clegg-Antrone), baseando-se no teor de amidos hidrolisáveis e açúcares solúveis (Novoa *et al.*, 1993)

e) Minerais : determinou-se o teor de cinzas da casca por pesagem direta da amostra inicial e do resíduo após calcinação em mufla à 650°C durante 4 horas (AOAC, 1992).

f) Fósforo: foi determinado por colorimetria após dissolução das cinzas com HCl e reação destas com vanadato-molibdato de amônio (Pregnotatto & Pregnotatto, 1985).

2.2.4. Composição química da casca *in natura*

Determinou-se os principais componentes químicos presentes na casca de ovo *in natura*, por Difração de Raio X (DRX) (Miranda-Pinto *et al.*, 1996), sendo que a amostra utilizada foi a mesma preparada para a análise de SEM, uma vez que esta análise é feita em paralelo, no mesmo equipamento; a análise de DRX foi realizada com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura Philips XL 30.

2.2.5. Estrutura microscópica da casca *in natura* e após tratamento ácido

Analisou-se a estrutura microscópica da casca através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura Philips XL 30. As amostras de casca de ovo e membrana *in natura* e casca de ovo após tratamento com ácido cítrico 30 % foram preparadas da seguinte forma: fixou-se as amostras com fita dupla-face sobre suportes de alumínio; recobriu-se então, com uma camada de ouro de 350 Å de espessura em um aparelho à vácuo Polaron E5000 (de Francisco, 1989).

2.2.6. Avaliação microbiológica:

A casca de ovo *in natura* e o sal de cálcio obtido foram submetidos a testes microbiológicos, conforme metodologia oficial:

a) Contagem de Coliformes Totais e de origem Fecal - Técnica NMP, conforme Anexo 2 (APHA, 1992).

b) Detecção de *Salmonella spp* - Método convencional, conforme Anexo 3 (APHA, 1992).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. RENDIMENTO DA REAÇÃO DA CASCA COM ÁCIDO

Entre as soluções utilizadas, a que apresentou o melhor resultado foi a solução de ác. cítrico 30 %, obtendo-se após lavagem e secagem do sal, 74 g de produto; em todos os testes partiu-se de 50 g de casca. Calculou-se, então o rendimento da reação:

Para o CaCO_3 (carbonato de cálcio) \longrightarrow $PM_{\text{carb}} = 100,09 \text{ g/gmol}$

Para o $\text{Ca}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$ (citrato de cálcio) \longrightarrow $PM_{\text{citr.}} = 230,13 \text{ g/gmol}$

$m_i = 48 \text{ g CaCO}_3$ (50 g da casca com cerca de 95 % de CaCO_3)

$m_f = 74 \text{ g}$ produto final

Massa de citrato de cálcio que deveria ser formada para um rendimento de 100 % (χ):

$$\chi = \frac{48 \text{ g} \times 230,13 \text{ g/gmol}}{100,09 \text{ g/gmol}} = 110,36 \text{ g de citrato de cálcio}$$

$$\text{Rendimento: } \eta = \frac{\chi}{m_f} \times 100 \longrightarrow \eta = 67 \%$$

O valor obtido para o rendimento, no caso do tratamento da casca com ácido cítrico 30 % foi de 67 %.

3.2. TETE DE SOLUBILIDADE

Mediu-se o pH durante reação da casca com soluções de ác. cítrico 10, 20 e 30 % para determinar-se qual a quantidade ideal de casca a ser adicionada a um volume conhecido de ácido, para evitar-se o excesso de ácido ou de casca. No caso da reação com o ácido cítrico 30 % este valor ficou melhor explicitado, observando-se uma estabilização do pH (Figura 3), após adição de 4 g de casca (considerando-se os 50 ml de ácido iniciais); atingiu-se a saturação da solução e o sal resultante precipitou-se. A partir deste ponto, qualquer adição de casca resultou em um aumento do pH pois, tinha-se um excesso de CaCO_3 .

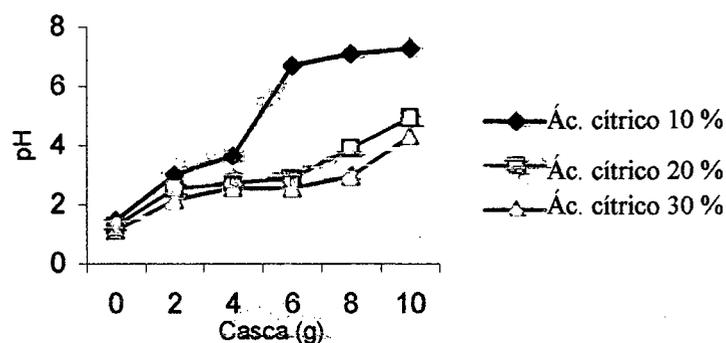


FIGURA 3 - Evolução do pH durante a reação entre soluções de ácido cítrico e a casca

3.3. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Após análise da composição centesimal da casca de ovo, obteve-se os resultados apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 - Resultado da análise da composição centesimal da casca de ovos de galinha (Florianópolis, Agosto de 1997)

Componente	Composição ^a (%)
Minerais	94
Proteínas	4
Carboidratos	0,7
Água	1
Lipídios	0,3

^a Valor médio

Estes resultados estão de acordo com Cheftel *et al.* (1989), Thapon *et Bourgeois* (1994), e outros autores.

Na análise do teor de fósforo da casca de ovo, fez-se a curva padrão (Figura 4) e determinou-se a equação da reta e o coeficiente de correlação:

$$y = 0,1296 x - 0,1123$$

$$R^2 = 0,9561$$

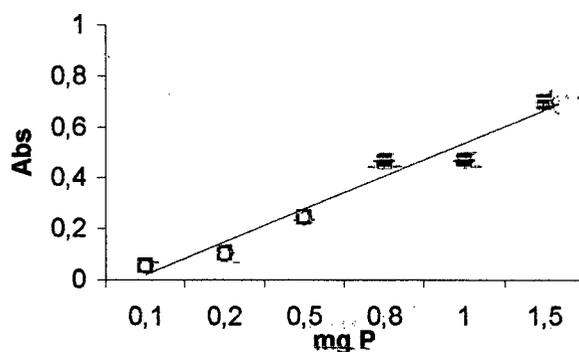


FIGURA 4 – Curva padrão para determinação de fósforo na casca de ovo

Usando-se a equação da reta obtida na curva padrão, calculou-se a concentração de fósforo na casca de ovo e nas membranas da casca (Tabela 5).

TABELA 5 - Concentração de fósforo na casca de ovo e nas membranas da casca (Florianópolis, Agosto de 1997)

Amostra	Fósforo ^a (mg/g)
Casca de ovo de galinha	1,60
Membranas da casca	0,57

^a Valores médios

3.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CASCA *IN NATURA*

Determinou-se os principais componentes químicos presentes na casca de ovo usando-se a técnica de DRX e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6. O gráfico de DRX obtido pode ser encontrado no Anexo 4.

TABELA 6 - Principais elementos químicos da casca de ovo, identificados por DRX (Florianópolis, Setembro de 1997)

Elemento	Composição (%)
Cálcio	47,50
Carbono	25,84
Oxigênio	25,33
Silício	0,74
Magnésio	0,60

Os resultados obtidos indicam que o cálcio é o maior constituinte (47,50 %) da casca de ovo; estes dados estão de acordo com valores apresentados por outros autores (Thapon *et Bourgeois*, 1994; Leach, 1982; Whitaker & Tannenbaum, 1977).

3.5. ESTRUTURA MICROSCÓPICA DA CASCA *IN NATURA* E APÓS TRATAMENTO ÁCIDO

Analisou-se a estrutura microscópica da casca *in natura*, após tratamento com ácido cítrico 30 % e da membrana da casca *in natura*, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV); as amostras foram fixadas sobre um suporte e recobertas com uma camada de ouro.

As microfotografias obtidas são apresentadas nas Figuras 5, 6, 7 e 8.

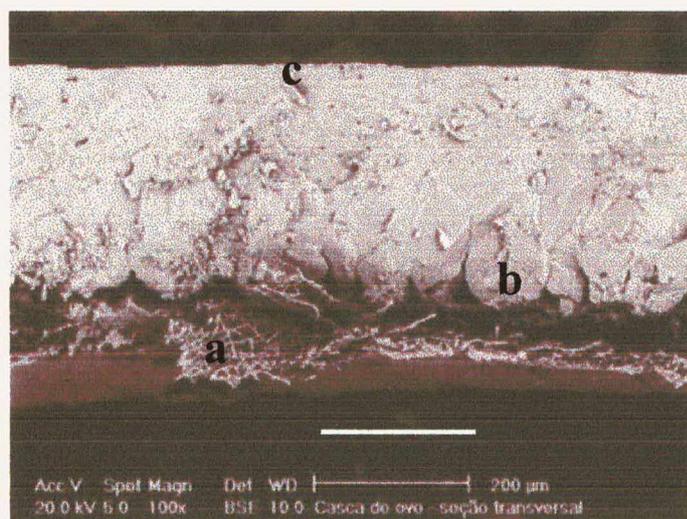


FIGURA 5 - MEV da casca de ovo, evidenciando (a) as duas camadas de membranas (interna e externa), (b) os cones *palisade* e (c) a camada superior onde localiza-se a cutícula.

(barra = 200 µm)

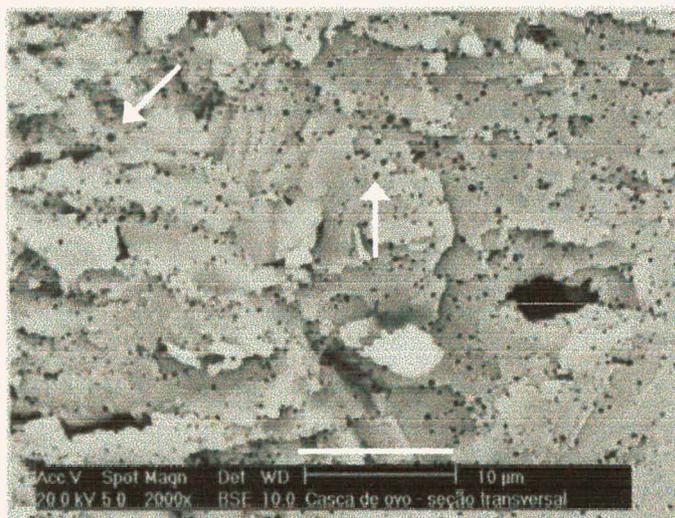


FIGURA 6 - MEV de um corte transversal da casca *in natura*, evidenciando os poros (setas) (barra = 10 μm)

Após o tratamento da casca com ácido cítrico 30 % a estrutura dos cristais presentes no sal obtido revelou-se de forma irregular (conforme Figura 7), o que não é observado no caso da casca *in natura*, onde tem-se cristais de carbonato de cálcio de forma hexagonal bem definida, conhecida como calcita (Leach, 1982), os quais poderiam ser visualizados com uma ampliação maior da amostra anterior (Figura 6).

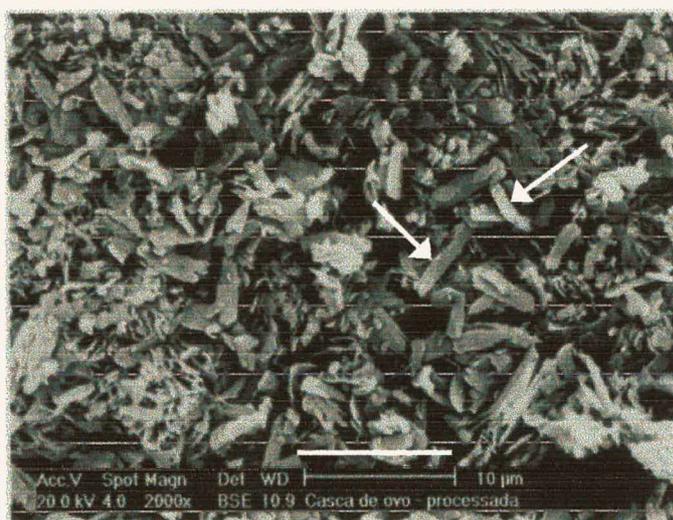


FIGURA 7 - MEV da casca de ovo após tratamento com ácido cítrico 30 %; observa-se a distribuição microscópica irregular do citrato de cálcio obtido (setas), ao contrário da forma regular do carbonato de cálcio, presente na casca *in natura*.

(barra = 10 μm)

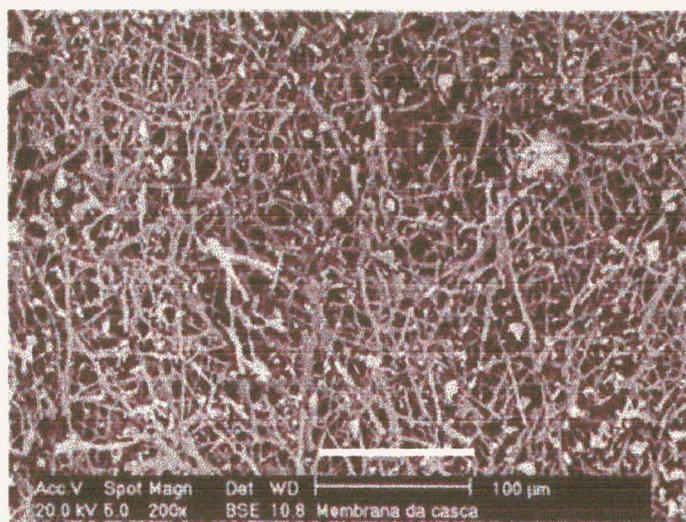


FIGURA 8- MEV da membrana da casca, evidenciando o denso emaranhado de fibras protéicas que a constituem (barra = 100 μ m)

3.6. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Avaliou-se a qualidade microbiológica da casca de ovo *in natura* e após tratamento com ácido cítrico 30 % com relação à presença de Coliformes Totais e Fecais, e de *Salmonella spp* (Tabela7).

TABELA 7 - Resultados das análises de Coliformes Totais e Fecais (NMP/g) e *Salmonella spp* (UFC / 25g) na casca de ovo.

(Florianópolis, Fevereiro de 1998)

Amostra	Salmonelas (UFC / 25g)	Coliformes Totais NMP / g ^a	Coliformes Fecais NMP / g ^a
Casca de ovo in natura	ausência	$2,1 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$
Casca tratada com Ác. cítrico 30 %	ausência	$4,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$

^a De acordo com Tabela de NMP para série de três tubos (Anexo 5).

Na legislação em vigência no País atualmente (Brasil, 1998), não existem padrões microbiológicos específicos para cascas de ovos; o que existe são padrões referentes a ovos e produtos derivados (Tabela 8).

TABELA 8 - Padrões microbiológicos para ovos e produtos derivados

Produto	Salmonelas (ausência em)	Coliformes Totais NMP (máximo)	Coliformes Fecais NMP (máximo)
Ovo inteiro cru	25 g	-	-
Ovo inteiro cozido	25 g	-	-
Ovo líquido pasteurizado, resfriado ou congelado	25 g	-	Ausência / 1 g
Ovo desidratado ou liofilizado	25 g	-	10 /g

Fonte: Brasil (1998).

Comparando-se os valores obtidos na contagem de Coliformes Fecais na casca de ovo tratada com ácido cítrico 30 % (NMP = 30), com o limite apresentado para ovo desidratado ou liofilizado (considerando-se que não existem padrões específicos para a casca de ovo), o produto obtido estaria fora dos padrões estabelecidos pela legislação (NMP = 10).

Esta alta contagem de Coliformes no produto final seria inesperada, considerando-se o tratamento térmico aplicado (60°C durante 60 + 30 minutos) e as condições químicas drásticas aplicadas durante o processamento (ácido cítrico a 30 %, durante 12 horas).

O fato de ter-se a estes presença destes microorganismos pode ser justificado por uma possível recontaminação durante o processo, visto que o moinho de martelos utilizado para a moagem da matéria-prima, após sua devida higienização era também utilizado para a moagem do produto final obtido; outra justificativa possível baseia-se na estrutura fibrosa (basicamente protéica) no interior dos poros da casca, onde pode-se ter o acúmulo de microorganismos, pelo difícil acesso seja por meios físicos ou químicos de descontaminação, levando a uma alta carga microbiana, mesmo após o processamento das cascas.

De qualquer forma este fato é preocupante pois, considerando-se que o produto está fora dos limites estabelecidos pela legislação pertinente, e o fato de que este vai ser utilizado como matéria-prima em alguma formulação, deve-se sempre partir de um produto livre de contaminação ou, pelo menos, com a menor carga bacteriana possível, o que justificaria um novo tratamento térmico para destruição destes microorganismos (como pasteurização ou esterilização do produto final) ou, algum outro método de descontaminação.

3.7. FATORES ECONÔMICOS

A matéria-prima utilizada (cascas de ovos) não apresentou nenhum custo, visto que esta foi fornecida por uma confeitaria local. Outros fatores que contribuíram para a composição do custo final do produto obtido foram os reagentes utilizados durante o processamento e os insumos básicos.

Para a obtenção de 74 g de citrato de cálcio partiu-se de 50 g de casca reagindo-as com 100 ml de ácido cítrico 30 % (30 g de ácido cítrico) e utilizou-se também em cada tratamento 50 ml de álcool etílico, para a lavagem do sal obtido; tendo-se o preço destes reagentes, pode-se compor o preço para obtenção de 1 kg de citrato de cálcio (Tabela 9).

TABELA 9 - Composição do custo para obtenção de 1 kg de citrato de cálcio

Reagente	Quantidade utilizada *	Custo unitário	Custo Total * (R\$)
Ácido cítrico <i>p.a.</i>	405,40 g	R\$ 7,60 / kg	R\$ 3,08
Álcool etílico <i>p.a.</i>	0,6757 L	R\$ 6,10 / L	R\$ 4,12
* Para obtenção de 1 kg de citrato de cálcio.			$\Sigma = \text{R\$ } 7,12$

Teve-se outros gastos, dentre os quais pode-se citar:

- Energia elétrica
- Água
- Mão-de-obra

Como estes gastos já são incluídos nas despesas do laboratório, foram desconsiderados para a composição do custo final do produto, assim como os gastos com os meios de culturas, os quais foram fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia. No caso da obtenção do sal a nível industrial, estes gastos seriam de importância fundamental

Chega-se então ao custo final para a obtenção do citrato de cálcio partindo-se de cascas de ovos: **R\$ 7,20 / kg de sal**. Comparando-se este valor com o preço atual de mercado (R\$ 27,00 / kg citrato de cálcio *p.a.*), obteve-se uma redução de custos de 73 %; deve-se levar em conta o fato de que o produto disponível no mercado é puro enquanto que o sal obtido a partir das cascas de ovos é impuro (pode apresenta resíduos de membranas, matéria orgânica, ...), o que não descarta em hipótese alguma o seu uso como complemento ou suplemento alimentar.

TOMO II

**VALORIZAÇÃO DA CASCA DE OVO
COMO SUBSTITUTO DE OSSOS**

INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com o Instituto Técnico de Avicultura, a França produziu 15,3 bilhões de ovos em 1994. Maior produtor de ovos da Europa, representou aproximadamente 19,4 % da produção naquele ano, situando-se na oitava posição em termos de produção a nível mundial, depois da China (173 bilhões), EUA (75,2), Japão (44,1), Rússia (37,1), Índia (24,9), Brasil (24,4) e México (21,2). Em 1995, o consumo de ovos na França foi de aproximadamente 263 ovos *per capita*, representando um aumento de 1,2 % em relação a 1994.

Considerando-se o número de ovos produzidos, e o fato de que a casca representa cerca de 10 % do peso total do ovo (aproximadamente 5,5 g por ovo), observa-se que o volume de cascas gerado é significativo e, atualmente, apenas uma pequena parte deste volume é utilizada em alguns países na agricultura, para correção do pH em solos ácidos ou, como suplemento alimentar para animais.

O objetivo principal nesta segunda etapa do trabalho foi valorizar a casca de ovos, utilizando-a como um substituto de ossos, em implantes (Dupoirieux, 1995). Atualmente existem diferentes materiais sendo usados para tal fim, tais como osso bovino e corais, mas o primeiro em breve não será permitido devido à sua origem e o segundo é uma fonte muito cara. Cascas de ovos podem representar uma alternativa barata e eficiente, podendo-se obter bons resultados mas, para este uso, as cascas devem estar livres de proteínas, a fim de prevenir qualquer rejeição ou reação inflamatória, após o implante.

A qualidade da casca do ovo e a mineralização dos ossos são influenciadas pelos nutrientes ingeridos através da dieta e do grau de disponibilidade destes nutrientes, sendo que estes podem ter influência até sobre a produção dos ovos (Keshavarz, 1996).

No Capítulo I, utilizou-se diferentes processos para tratar a casca e procurou-se as condições ideais para preparar-se cascas com um teor reduzido de proteínas.

No Capítulo II, estudou-se a composição das membranas da casca e a hidrólise enzimática destas membranas, para serem usadas também como material base para implantes em ossos, considerando-se que é sobre estas membranas onde inicia-se a mineralização das cascas; as membranas contêm Colágeno Tipo I e Tipo X em sua estrutura (Nys *et al.*, 1998) e o Colágeno Tipo X inibe a mineralização (Arias *et al.* 1997). Assim sendo, após a extração ou degradação enzimática deste colágeno, as membranas devem apresentar um melhor efeito sobre a mineralização.

CAPÍTULO I

PREPARO DE CASCAS COM TEOR REDUZIDO DE PROTEÍNAS PARA SER USADA COMO SUBSTITUTO DE OSSOS, EM IMPLANTES

1. INTRODUÇÃO

A casca dos ovos é composta por cerca de 95 % minerais, 3,3 % matéria orgânica e 1,7 % água (Thapon *et Bourgeois*, 1994).

Apresenta uma estrutura perfeitamente ordenada (Parsons, 1982) que resulta da deposição de carbonato de cálcio principalmente na forma de cristais de calcita (aproximadamente 95 % do peso de casca), e material orgânico na forma de membranas e matriz orgânica (3.5 %) (Gautron *et al.*, 1996). A superfície exterior é composta por uma cutícula de proteínas de espessura aproximada entre 10-30 μm (Baker *et al.*, 1997).

A arquitetura básica da casca é notadamente constante entre as muitas espécies da classe *Aves* com uma espessura que freqüentemente varia de 280 a 400 μm em galinhas da espécie *Leghorn* (Parsons, 1982) e é dividido em seis camadas (Figura 9).

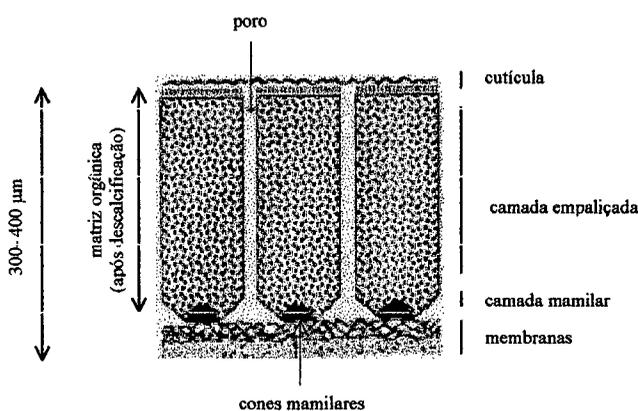


FIGURA. 9 - Desenho esquemático da seção radial da casca de ovo (Adaptado de Dupoirieux, 1995)

As duas camadas internas são as membranas interna e externa da casca. A camada subjacente é chamada de mamilar, composta por cones irregulares. A camada empaliçada estende-se por 200 μm desde a base dos cones, até uma capa delgada de cristais verticais alinhada perpendicularmente à superfície da casca (Nys *et al.*, 1998). A cutícula, uma camada orgânica, é depositada na superfície externa e contém a maior parte (2/3) dos pigmentos da casca (Nys *et al.*, 1991).

A formação de casca de ovo é um dos mais rápidos processos de mineralização conhecidos, e acontece diariamente durante um período de aproximadamente 18 horas.

A ligação extremamente forte entre a membrana externa e a casca calcificada torna impossível sua separação total, seja de forma manual ou por meios químicos, sem o risco de causar algum dano à camada cristalina mamilar, especialmente quando trata-se de métodos químicos que envolvam a extração do cálcio da casca (Reid, 1983); devido a isto, torna-se difícil a padronização de um método para a redução do teor de proteínas na casca, considerando-se que as membranas representam quase que a totalidade destas proteínas.

Desde que o primeiro transplante de ossos foi realizado com sucesso em 1668, mais de 50 substitutos de ossos já foram descritos pela literatura (Dupoirieux *et al.*, 1995).

Entre os materiais inorgânicos, os sais de cálcio foram os primeiros a apresentar resultados satisfatórios; eles apresentam a vantagem de imitar a fase mineral dos ossos humanos e não causam nenhuma resposta imunológica, considerando-se que não apresentam células vivas ou matriz orgânica (Burchardt, 1983).

Considerando-se a composição da casca de ovo (basicamente mineral), e o fato de que a formação destas cascas representa um intrigante modelo de mineralização, estudou-se o uso destas cascas em implantes ósseos, a fim de estabelecer-se sua capacidade de osteoindução (induzir à mineralização de ossos) (Dupoirieux, Neves & Pourquier, 1998).

Miranda-Pinto *et al.* (1996) estudaram o uso do carbonato de cálcio, proveniente da casca de ovo, como reagente inicial para a síntese de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, uma biocerâmica amplamente empregada em próteses dentárias e ósseas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. PREPARO DA CASCA PULVERIZADA

Amostras de ovos de galinha da raça *Leghorn* (brancos) foram usadas em todos os experimentos. Os ovos foram lavados em água destilada, quebrados e esvaziados. As cascas foram enxaguadas abundantemente em água destilada, a membrana interna foi separada manualmente (Reid, 1983; Dupoirieux *et al.*, 1995; Gautron *et al.*, 1996); as cascas foram secas à 50°C durante 30 minutos e moídas manualmente com um pistilo de porcelana, até a obtenção de partículas com tamanho uniforme ($\phi_{\text{méd}} = 400\mu\text{m}$).

2.1.1. Teor de proteínas na casca pulverizada

O teor de proteínas (TP) foi analisado seguindo-se o método oficial Kjeldahl (AOAC, 1992), com o auxílio de um bloco de mineralização (1041, Bioblock Scientific) e uma unidade de destilação (1042, Bioblock Scientific).

O teor de proteínas foi calculado usando-se o fator de conversão específico 6,25.

Cada análise foi feita em duplicata, usando-se aproximadamente 1 g de amostra por análise.

2.2. PREPARO DE CASCA COM TEOR REDUZIDO DE PROTEÍNAS

Diferentes tratamentos foram utilizados com o objetivo de minimizar o teor de proteínas na casca. Em todos os tratamentos usou-se cerca de 5 g de casca pulverizada para 100 ml de cada solução de tratamento (com exceção dos tratamentos de aquecimento e hidrólise enzimática). Depois de cada tratamento, os produtos obtidos foram desidratados à 50°C durante 30 minutos e guardados em recipientes hermeticamente fechados, para análise posterior.

2.2.1. Branqueamento com hipoclorito de sódio (Peebles *et al.*, 1987; Hincke *et al.*, 1992; Nys *et al.*, 1998).

Este estudo foi realizado usando-se soluções comerciais de hipoclorito de sódio (NaClO) a diferentes concentrações: 3,1 % de cloro ativo (12° Clorométricos) e 6,2 % de cloro ativo (24° Clorométricos). Os tratamentos foram feitos à temperatura ambiente e à

30°C, sob agitação constante com o auxílio de um agitador magnético FANEM mod.258, durante 24 horas (as soluções foram renovadas depois das primeiras 12 horas); logo após, as soluções foram descartadas e o pó retido foi lavado por 10 vezes com 200 ml de água destilada em cada lavagem, a fim de eliminar o cloro residual. Na última lavagem foi feita uma centrifugação à 5.000 g/min. durante 5 minutos, a fim de eliminar as membranas residuais, e o sobrenadante foi descartado.

2.2.2. Tratamento ácido

Este estudo foi realizado usando-se soluções de HCl 1N. Os tratamentos foram feitos à temperatura ambiente durante 20 minutos sob agitação constante com o auxílio de um agitador magnético FANEM mod. 258; logo após, a lavagem foi feita da mesma forma que no branqueamento.

2.2.3. Tratamento alcalino

Utilizou-se as mesmas condições que no tratamento ácido, usando-se, neste caso, uma solução de NaOH 1N; ao final, a lavagem foi feita da mesma forma.

2.2.4. Tratamento de oxidação

Este estudo foi realizado usando-se soluções de H₂O₂ a diferentes concentrações: 35 % e 17,5 % (v/v). Os tratamentos foram feitos à temperatura ambiente e a 30°C, durante 6 e 24 horas, sob agitação constante com o auxílio de um agitador magnético FANEM mod.258. Após o tratamento, a lavagem foi feita da mesma forma.

2.2.5. Branqueamento associado com tratamento ácido

Depois do tratamento de branqueamento usando-se 6,2 % Cl ativo à 30°C durante 24 horas, uma parte dos produtos obtidos foi submetida ao tratamento ácido, sob as mesmas condições usadas no primeiro tratamento ácido.

2.2.6. Branqueamento associado com tratamento alcalino

Depois do tratamento de branqueamento usando-se 6,2% Cl ativo a 30°C durante 24 horas, uma parte dos produtos obtidos foi submetida ao tratamento alcalino, sob as mesmas condições usadas no primeiro tratamento alcalino.

2.2.7. Aquecimento

Este estudo foi realizado usando-se 5 g de cascas pulverizadas em cada análise, as quais foram submetidas a diferentes temperaturas em mufla: 400, 300 e 150°C, durante 3 horas.

2.2.8. Branqueamento associado com aquecimento

Depois do tratamento de branqueamento (item 2.2.1), uma parte dos produtos obtidos foi submetida ao aquecimento à 300°C, durante 3 horas.

2.2.9. Aquecimento associado com branqueamento

Depois do aquecimento à 400, 300 e 150°C durante 3 horas, uma parte dos produtos obtidos foi submetida ao branqueamento usando-se 6,2 % Cl ativo à 30°C, durante 24 horas.

2.2.10. Aquecimento associado com oxidação por H₂O₂

Depois do aquecimento à 400°C durante 3 horas, uma parte dos produtos obtidos foi submetida a oxidação usando-se H₂O₂ 35 % à temperatura de 30°C, durante 24 horas.

2.2.11. Hidrólise enzimática

A enzima usada foi a pepsina 1:2.500 (Pepsin UM; EC 3.4.23.1) da Sigma (Sigma Cia. Química, St. Louis, MO. E.U.A.).

Este estudo foi realizado usando-se uma solução contendo 0,05 % de pepsina em ácido acético 0,5 M. Duas taxas diferentes de enzima/substrato (E/S) foram usadas: E/S = 20 % e E/S = 40 %; para o primeiro teste, usou-se 5 g de casca pulverizada em 50 ml de solução de pepsina 0,05 %; para o segundo teste usou-se 5 g de casca em 100 ml de solução de pepsina 0,05 %.

A hidrólise foi feita à 37°C durante 24 horas (Arias *et al.*, 1997), sob agitação constante com o auxílio de um agitador magnético FANEM mod. 258. Ao fim deste tempo, o conteúdo inteiro foi submerso em um banho-maria em ebulição durante 10 minutos, para inativar a atividade da enzima.

Após hidrólise, centrifugou-se a mistura à 5.000 g/min. durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante; o sólido retido foi lavado da mesma forma descrita no item 2.2.1.

2.2.12. Hidrólise enzimática associada com branqueamento

Depois da hidrólise enzimática à taxa E/S = 40 %, uma parte dos produtos obtidos foi submetida ao branqueamento usando-se 6,2 % Cl ativo à 30°C, durante 24 horas, sob agitação constante com o auxílio de um agitador magnético FANEM mod. 258.

2.2.13. Tratamento de oxidação por *plasma ashing* (Reid, 1983; Kim, 1995)

O *plasma ashing*, técnica que faz uso do fato de que o gás oxigênio, quando ionizado pela aplicação de energia de rádio frequência, sob condições de pressão cuidadosamente controladas, forma um plasma altamente reativo, a baixa temperatura. A reação entre o plasma formado e o carbono presente na amostra remove o componente orgânico, enquanto deixa o material cristalino intacto.

Este estudo é realizado colocando-se amostras sobre placas de vidro dentro da câmara da unidade de plasma químico; a seguir, é feito o vácuo na câmara de reação e o O₂ é injetado. A potência aplicada foi de 100 W durante três tempos diferentes: 15, 30 e 45 minutos.

Estes tratamentos foram realizados no Centro de Transferência de Tecnologia, Le Mans, França.

2.2.14. *Plasma ashing* associado com branqueamento

Depois da oxidação da casca por *plasma ashing*, uma parte dos produtos obtidos foi, em seguida, submetida ao branqueamento usando-se 6,2 % Cl ativo à 30°C, durante 24 horas e lavagem.

2.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS E REDUÇÃO DE PROTEÍNAS

O teor de proteínas (TP) de todos os produtos obtidos foi analisado pelo método oficial Kjeldahl (AOAC, 1992).

A redução no TP depois de cada tratamento foi calculada relacionando-se o conteúdo de proteínas após o tratamento, com o conteúdo de proteínas na amostra inicial, de acordo com a equação:

$$\text{Redução} = \left(\frac{\text{TP}_{\text{inicial}} - \text{TP}_{\text{final}}}{\text{TP}_{\text{inicial}}} \right) \times 100$$

2.4. TEOR DE PROTEÍNAS EM ALGUNS MATERIAIS USADOS PARA IMPLANTES EM OSSOS

Analisou-se o teor de proteínas em alguns materiais que são atualmente usados como substitutos de ossos, em implantes: casca de ovo de avestruz, concha de coral e osso bovino.

O teor de proteínas foi determinado pelo método oficial Kjeldahl (AOAC, 1992).

2.5. DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA CASCA

Utilizou-se cascas de ovos marrons para realizar este experimento, sendo o único teste no qual usou-se cascas marrons, por motivos econômicos, visto que trabalhou-se com quantidades de amostras bem maiores do que aquelas usadas até então; os ovos de casca branca representam uma pequena parte dos ovos produzidos na Europa e, conseqüentemente, são mais caros que aqueles de casca marron. As cascas foram trituradas em um *mixer* durante 2 minutos e depois por uma série de peneiras, com aberturas de: 400, 300, 150, 75 e 50 μm ; o conjunto de peneiras foi agitado com o auxílio de um agitador *Ro-tap*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ANÁLISE DO TEOR DE PROTEÍNAS NA CASCA PULVERIZADA

Sete amostras de casca pulverizada (sem membranas) foram preparadas, e a análise do teor de proteínas nestas amostras apresentou um valor médio de **2,55 % ± 0.14**.

3.2. REDUÇÃO NO TEOR DE PROTEÍNAS

Os dados obtidos para a redução no teor de proteínas são apresentados a seguir. Nos tratamentos onde tinha-se mais de uma variável ou seja, temperatura, concentração da solução ou tempo de tratamento (Tabelas 9 a 16), os dados foram tratados estatisticamente; fez-se uma análise de variância (ANOVA), a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre eles, a um nível de significância de 5 %. Utilizou-se, para tal análise, o software Statgraphics 7.0 e fez-se a análise ANOVA unidimensional.

Como na ANOVA verificou-se diferenças significativas entre os valores, fez-se um teste de amplitude para identificar entre quais tratamentos, tinha-se diferenças significativas. Fez-se esta análise através do teste de Tukey.

3.2.1. Branqueamento com hipoclorito de sódio

Os resultados deste tratamento são apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 - Redução no TP na casca tratada por branqueamento
(Rennes, Abril de 1998)

Tratamento	Redução no TP* (%)
3,1% NaClO, temp. amb.	57,85
6,2% NaClO, temp. amb.	62,23
3,1% NaClO, 30°C	60,64
6,2% NaClO, 30°C	63,47

* valor médio; todos os valores são estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5 %.

3.2.2. Tratamento ácido

O valor médio de redução de proteínas nas cascas tratadas por HCl 1N à temperatura ambiente durante 20 minutos foi de **33,73 %**.

O tratamento ácido das cascas resultou em índices muito baixos de redução no teor de proteínas, principalmente quando comparado com outros tratamentos (por exemplo, 82,34 % de redução obtidos após hidrólise enzimática associado com branqueamento).

3.2.3. Tratamento alcalino

Cascas de ovo tratadas com NaOH 1N à temperatura ambiente durante 20 minutos apresentaram um valor médio de redução no teor de proteínas de 9,66 %.

Tanto no caso do tratamento ácido quanto no tratamento alcalino não obteve-se valores satisfatórios para a redução do teor de proteínas. Estes fatos podem estar relacionados com a estrutura da membrana, basicamente protéica, contendo colágeno. Pode-se ter causado reações de gelatinização deste colágeno visto que por exemplo, para a extração de gelatina a partir da pele de suínos utiliza-se soluções de ácido clorídrico em pH 4 e, para a extração de gelatina a partir do couro de bovinos utiliza-se soluções de hidróxido de cálcio em pH 12,6 (Grant, 1980).

3.2.4. Tratamento de oxidação

Este tratamento apresentou baixos valores de redução no teor de proteínas da casca (Tabela 11), mesmo a elevadas concentrações de H₂O₂.

TABELA 11 - Redução no TP na casca tratada por oxidação com H₂O₂
(Rennes, Abril de 1998)

Tratamento	Redução no TP * (%)
durante 24 horas	
H ₂ O ₂ 17,5 %, temp. amb.	14,92
H ₂ O ₂ 17,5 %, 30°C	19,90
H ₂ O ₂ 35 %, temp. amb.	19,39
H ₂ O ₂ 35 %, 30°C	38,71
durante 6 horas	
H ₂ O ₂ 17,5 %, temp. amb.	15,49
H ₂ O ₂ 17,5 %, 30°C	11,32
H ₂ O ₂ 35 %, temp. amb.	14,12
H ₂ O ₂ 35 %, 30°C	12,16

* valor médio; todos os valores são estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5 %.

3.2.5. Branqueamento associado com tratamento ácido

O valor médio de redução no teor de proteínas da casca tratada por branqueamento com NaClO 6.2 % à 30°C, durante 24 horas e, logo após, com HCl 1N à temperatura ambiente durante 20 minutos foi de **22,81 %**.

3.2.6. Branqueamento associado com tratamento alcalino

O valor médio de redução no teor de proteínas da casca tratada por branqueamento com NaClO 6.2 % à 30°C, durante 24 horas e NaOH 1N à temperatura ambiente durante 20 minutos foi de **43,26 %**.

3.2.7. Aquecimento

Este estudo foi realizado a diferentes temperaturas em mufla: 400, 300 e 150°C, durante 3 horas e os resultados são apresentados na Tabela 12.

TABELA 12 - Redução no TP na casca tratada por aquecimento
(Rennes, Abril de 1998)

Tratamento	Redução no TP* (%)
400°C	70,41
300°C	67,75
150°C	2,57

* valor médio; todos os valores são estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5 %.

Todos os produtos obtidos por aquecimento apresentaram uma coloração marron; sendo assim, mesmo obtendo-se uma boa redução no teor de proteínas da casca, estes tratamentos devem ser descartados pois, produtos que apresentem esta coloração são indesejáveis para utilização como implantes em ossos.

3.2.8. Branqueamento associado com aquecimento

Todas as amostras foram tratadas à 300°C durante 3 horas em mufla depois do tratamento de branqueamento, e apresentaram valores elevados de redução no teor de proteínas da casca (Tabela 13) mas, todos os produtos obtidos apresentaram uma coloração marron.

TABELA 13 - Redução no TP na casca tratada por branqueamento e aquecimento
(Rennes, Abril de 1998)

Tratamento	Redução no TP* (%)
3,1 % NaClO, temp. amb., 24 h. + aquec.	68,08
6,2 % NaClO, temp. amb., 24 h. + aquec.	67,18
3,1 % NaClO, 30°C, 24 h. + aquec.	71,56
6,2 % NaClO, 30°C, 24 h. + aquec.	69,49

* valor médio; todos os valores são estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5 %.

3.2.9. Aquecimento associado com branqueamento

Todas as amostras foram tratadas por branqueamento (NaClO 6.2 % à 30°C, durante 24 horas), depois do aquecimento e os índices de redução no teor de proteínas são apresentados na Tabela 14.

TABELA 14 - Redução no TP na casca tratada por aquecimento e branqueamento
(Rennes, Abril de 1998)

Tratamento	Redução no TP* (%)
400°C, 3 h. + branqueamento	78,59
300°C, 3 h. + branqueamento	75,81
150°C, 3 h. + branqueamento	69,88

* valor médio; todos os valores são estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5 %.

Buscando-se o desaparecimento da coloração marron após o tratamento, inverteu-se a ordem, fazendo-se o branqueamento das amostras após o aquecimento; mesmo assim, os produtos obtidos ainda apresentaram a coloração marron indesejável para uso como implante.

3.2.10. Aquecimento associado com oxidação por H₂O₂

As cascas tratadas por aquecimento à 400°C durante 3 horas e oxidação com H₂O₂ 35% à temperatura de 30°C durante 24 horas, apresentaram 68,27 % como valor médio de redução no teor de proteínas.

3.2.11. Hidrólise enzimática

Este estudo foi realizado usando-se pepsina a duas taxas de enzima/substrato (E/S), durante 24 horas a 37°C; os resultados obtidos são apresentados na Tabela 15.

TABELA 15 - Redução no TP na casca hidrolisada pela pepsina (Rennes, Abril de 1998)

Tratamento	Redução no TP* (%)
E/S = 20 %, 37°C, 24 horas	45,79
E/S = 40 %, 37°C, 24 horas	49,58

* valor médio; todos os valores são estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5 %.

Apesar das altas taxas E/S usadas (20 % e 40 %), obteve-se baixos índices para a redução no teor de proteínas.

3.2.12. Hidrólise enzimática associada com branqueamento

A hidrólise enzimática da casca usando-se pepsina a uma taxa E/S = 40 % seguida de branqueamento com NaClO 6.2 % durante 24 horas à 30°C, apresentou 82,34 % como valor médio de redução no teor de proteínas.

3.2.13. Tratamento de oxidação por *plasma ashing*

Este tratamento foi realizado em presença de O₂, à potência de 100 W durante três diferentes tempos e obteve-se os resultados apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Redução no TP na casca tratada por *plasma ashing* (Rennes, Abril de 1998)

Tratamento	Redução no TP* (%)
O ₂ , 100 W, 45 min.	21,78
O ₂ , 100 W, 30 min.	18,12
O ₂ , 100 W, 15 min.	14,88

* valor médio; todos os valores são estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5 %.

Esta técnica não apresentou índices satisfatórios de redução no teor de proteínas; provavelmente o tempo usado (45 minutos, no máximo) não tenha sido suficiente. Esta mesma técnica já foi usado por Reid (1983) durante 3 horas para separar a matéria orgânica da casca.

3.2.14. *Plasma ashing* associado com branqueamento

Fazendo-se a oxidação por *plasma ashing* e o branqueamento com NaClO 6,2 % por 24 horas à 30°C, obteve-se melhores resultados, conforme valores na Tabela 17.

Tabela 17 - Redução no TP na casca tratada por *plasma ashing* e branqueamento (Rennes, Abril de 1998)

Tratamento	Redução no TP* (%)
O ₂ , 100 W, 45 min. + NaClO	68,37
O ₂ , 100 W, 30 min. + NaClO	64,53
O ₂ , 100 W, 15 min. + NaClO	63,94

* valor médio; todos os valores são estatisticamente diferentes, ao nível de significância de 5 %.

Identificou-se diferenças significativas entre todos os tratamentos para redução do teor de proteínas da casca, ao nível de significância de 5 % (conforme Tabela 18).

TABELA 18 – Comparação estatística entre os valores de redução no teor de proteínas (Rennes, Abril de 1998).

Tratamento	Redução no TP* (%)
Branqueamento (6,2 % NaClO, 30°C)	63,47
HCl 1 N, temperatura ambiente, 20 min.	33,73
NaOH 1 N, temp.amb., 20 min.	9,66
H ₂ O ₂ 17,5 %, temp.amb.	15,49
Branqueamento (6,2 % NaClO, 30°C)+ HCl 1 N	22,81
Branqueamento (6,2 % NaClO, 30°C)+ NaOH 1 N	43,26
Aquecimento (400°C)	70,41
Branqueamento (3,1 % NaClO) + aquecimento (300°C)	71,56
Aquecimento (400°C) + branqueamento (3,1 % NaClO)	78,59
Aquecimento (400°C) + H ₂ O ₂ 35 %	68,27
Hidrólise enzimática (E/S = 40 %)	49,58
Hidrólise enzimática + branqueamento	82,34
<i>Plasma ashing</i> (100 W, 45 min.)	21,78
<i>Plasma ashing</i> (100 W, 45 min.) + branqueamento	68,37

* valor médio.

O tratamento de hidrólise enzimática associada com o branqueamento, apresentou o maior índice de redução no teor de proteínas da casca. Resultados semelhantes já foram obtidos por Hincke *et al.* (1992), que usaram o branqueamento para separar as membranas.

3.3. TEOR DE PROTEÍNAS EM ALGUNS MATERIAIS UTILIZADOS PARA IMPLANTES EM OSSOS

O teor de proteínas nestes materiais foi analisado e os resultados estão na Tabela 19.

TABELA 19 – Teor de proteínas em alguns materiais usados para implantes em ossos (Rennes, Abril de 1998)

Material para implante	Proteínas (%)*
Casca de ovo de avestruz (após branqueamento)	1,34
Casca de ovo de galinha (após hidrólise enzimática e branqueamento)	0,70
Concha de corais	0,17
Osso bovino	29,29

* valor médio

O teor de proteínas nas conchas de corais é bastante reduzido; este produto é amplamente usado em implantes ósseos mas, apresenta um custo elevado.

3.4. DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA CASCA

Analisando-se a distribuição granulométrica obtida após este tratamento (Figura 10), a maioria das partículas (36 %) apresentou um diâmetro médio de 300 μm .

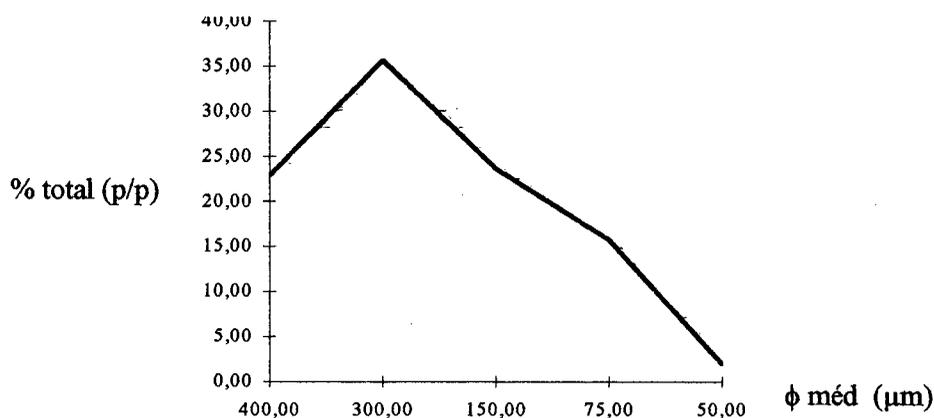


FIGURA 10 - Distribuição granulométrica da casca micronizada

CAPÍTULO II

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS MEMBRANAS DA CASCA

1. INTRODUÇÃO

As membranas da casca são formadas quando a gema ovulada, circundada pela clara, entra na seção de istmo do oviduto; normalmente este processo leva cerca de 1,25 horas (Chowdhury, 1990).

Pode-se identificar duas camadas de membrana na casca de ovo de galinha, compostas por uma cadeia de fibras proteínáceas que envolvem a gema e a clara.

Estas duas camadas de fibras aderem-se intimamente uma à outra, exceto na extremidade mais afinada do ovo, onde a câmara de ar é formada; neste ponto, a membrana interna contorna a superfície da clara do ovo, enquanto que a membrana externa adere-se à porção calcificada da casca.

As membranas representam a fundação sobre a qual inicia-se o depósito da casca; são compostas por material altamente insolúvel - principalmente proteína - cuja natureza foi reconhecida como sendo bastante complexa mas ainda não é bem entendida (Chowdhury, 1990).

A maior parte da composição das membranas, aproximadamente 70 a 75%, constitui-se de proteínas e é caracterizada por ter ligações disulfeto cruzadas, assim como ligações cruzadas de desmosina e isodesmosina derivadas da lisina (Figura 11). O restante das proteínas da membrana consiste em colágeno (10 %) e glicoproteínas (Leach, 1982).

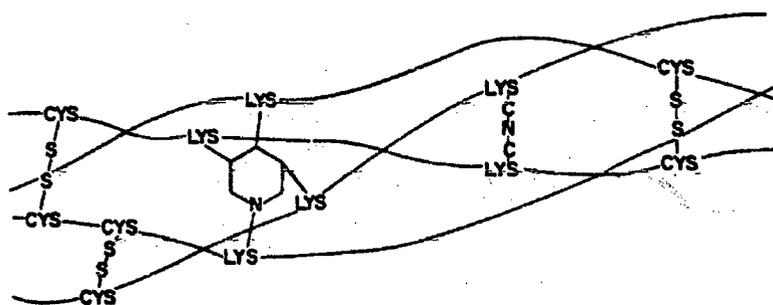


FIGURA 11 - Estrutura hipotetizada das membranas da casca. As cadeias de peptídeos são formadas por ligações cruzadas de disulfeto e derivadas da lisina.

(Leach, 1982)

As membranas da casca contêm colágeno dos tipos I e X, os quais são secretados por células de glândulas do istmo; a remoção química ou degradação deste colágeno induzem à formação *in vitro* de cálcio cristalino, sobre as fibras da membrana (Nys *et al.*, 1998); na região denominada *mammillary knobs*, já foi identificado sulfato de keratana, (Arias *et al.*, 1992).

Quando as fibras são visualizadas em um microscópio eletrônico de transmissão, observa-se um denso emaranhado de fibras com caroços, circundados por um manto (Leach, 1982), o que está de acordo com estudos microscópicos realizados na primeira etapa deste trabalho, envolvendo as membranas da casca. Os caroços orgânicos, ancorados na superfície da membrana externa da casca são constituídos por um complexo proteína-mucopolisacarídeos.

Comprovou-se a presença de Ovalbumina (Hincke, 1995), Lisozima e Ovotransferrina (Gautron *et al.*, 1997) nos locais de nucleação dos primeiros cristais de cálcio, sobre a membrana.

A composição de aminoácidos (AA) presente nas membranas da casca foi analisada por Leach (1982) e é apresentada na Tabela 20.

TABELA 20 - Composição em AA das membranas da casca de ovo

Amino ácido	Composição ^a
Lisina	3,0
Prolina	9,8
Alanina	4,1
Cisteína	10,4
Fenilalanina	1,7

Fonte: Leach (1982).

^a Dados expressos como resíduos / 100 resíduos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. PREPARO DA MEMBRANA

As membranas foram separadas manualmente das cascas (Reid, 1983; Dupoirieux *et al.*, 1995; Gautron *et al.*, 1996), e secas à temperatura ambiente; conservou-se em recipientes hermeticamente fechados para caracterização posterior.

2.1.1 Teor de proteínas na membrana nativa

O teor de proteínas foi analisado seguindo-se o método oficial Kjeldahl (AOAC, 1992) usando um bloco de mineralização (1041, Bioblock Scientific) e uma unidade de destilação (1042, Bioblock Scientific).

Os resultados foram calculados usando-se o fator de conversão específico 6,25.

Cada análise foi feita em duplicata, usando-se aproximadamente 0,5 g de amostra em cada uma.

2.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA MEMBRANA

Duas enzimas diferentes foram usadas na hidrólise da membrana: pepsina e flavourzima.

2.2.1. Hidrólise da membrana pela pepsina

A enzima usada foi pepsina 1:2,500 (Pepsina UM; EC 3.4.23.1) da Sigma (Sigma. Cia. Química, St Louis, MO. E.U.A.).

Utilizou-se uma solução de pepsina a 0.05 % em ácido acético 0.5 N (Arias *et al.*, 1997). A hidrólise foi feita a uma relação enzima/substrato (E/S) = 2 % (p/p), à 37°C durante 24 horas sob agitação magnética constante. A fim de aumentar a eficiência da reação, as membranas foram desintegradas em um *blender* Ultra Turrax a uma velocidade de 11.000 g/min. durante 30 segundos antes da hidrólise.

2.2.2. Hidrólise da membrana pela flavourzima

A enzima flavourzima mg Tipo B da Novo (Nordisk Bioindustry, Nanterre, França) é composta por um complexo proteases/peptidases produzido por fermentação do *Aspergillus oryzae*. O lote usado apresentava uma atividade atual de 1320 LAPU.g-1 (unit leucine aminopeptidase per gram). Um LAPU é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de L-leucine-p-nitroanilide por minuto no método padrão EAL-SM-0298.02:01 da Novo Nordisk..

A enzima foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 0.1 M adicionado de nitrito de sódio 0.02 % (como anti-microbiano); o pH final foi corrigido para 7, pela adição de NaOH ou HCl.

A hidrólise foi feita a duas taxas diferentes: E/S = 2 % e E/S = 5 % (p/p), à 40°C durante 24 horas sob agitação constante com o auxílio de um agitador magnético FANEM 258. A fim de aumentar a eficiência da reação, as membranas foram desintegradas em um *blender* Ultra Turrax a uma velocidade de 11.000 g/min. durante 30 segundos antes da hidrólise.

2.2.3. Cinética da hidrólise (Densidade Ótica)

Durante a hidrólise, foram retiradas alíquotas de 1 ml, em diferentes intervalos de tempo. A enzima foi inativada aquecendo-se a mistura em um banho-maria em ebulição durante 10 minutos. As alíquotas foram centrifugadas a 5.000 g durante 10 minutos e uma parte dos sobrenadantes obtidos foi congelada para posterior caracterização por eletroforese.

Após 24 horas de hidrólise toda a mistura foi submersa em banho-maria durante 10 minutos e congelada para caracterização posterior.

A Densidade Ótica (DO) dos sobrenadantes das alíquotas centrifugadas foi medida a 280 nm, com o auxílio de um espectrofotômetro Milton Roy (Spectronic 1201), conforme o método previamente utilizado por Guerin (1991).

2.3. CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA E DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE

2.3.1. Liofilização da membrana hidrolisada e dos sobrenadantes da hidrólise

As membranas hidrolisadas pelas diferentes enzimas e os sobrenadantes, após congelamento, foram liofilizados em um sistema SGD RP2V Divisão SERAIL, Argenteuil (95), França, para posterior caracterização por eletroforese.

2.3.2. Estudo de solubilização da membrana nativa

Como a solubilidade é um pré-requisito para a caracterização de proteínas (Nys *et al.*, 1998), e a membrana é extremamente insolúvel nas condições ambientes, fez-se alguns ensaios para estudar a solubilização de membranas nativas, seguindo-se métodos previamente utilizados por Guerin (1991).

Em todos os testes usou-se 30 mg de membrana nativa (previamente secas à temperatura ambiente) em 3 ml de cada solução teste.

a) Tratamento ácido

Este estudo foi feito usando-se soluções de HCl 4 N, 2 N e 1 N, à temperatura ambiente e à 37°C, durante 4 horas.

b) Tratamento alcalino

Este estudo foi feito usando-se soluções de NaOH 4 N, 2 N e 1 N, à temperatura ambiente e à 37°C, durante 4 horas.

c) Tratamento com dodecilsulfonato de sódio (SDS)

Este estudo foi feito usando-se soluções de SDS 10%, 4% e 2%, à temperatura ambiente e à 37°C, durante 4 horas.

d) Tratamento ácido associado com SDS 10 % e β -mercaptoetanol 0,5 M

Depois do tratamento ácido das membranas, adicionou-se SDS e β -mercaptoetanol, até as concentrações finais de 10 % e 0,5 M, respectivamente.

e) Tratamento alcalino associado com SDS 10 % e β -mercaptoetanol 0,5 M

Depois do tratamento alcalino das membranas, adicionou-se SDS e β -mercaptoetanol, até as concentrações finais de 10 % e 0,5 M, respectivamente.

f) Tratamento com SDS 10 % associado com β -mercaptoetanol 0,5 M

Depois do tratamento das membranas com SDS 10 %, adicionou-se β -mercaptoetanol até uma concentração final de 0,5 M.

2.3.3. Caracterização da membrana nativa e dos produtos de hidrólise, por eletroforese em gel de poli-acrilamida (PAGE) na presença de dodecilsulfonato de sódio (SDS) (Laemmli *et Favre*, 1973).

As proteínas foram caracterizadas em função do seu peso molecular por eletroforese em gel de poli-acrilamida - dodecilsulfonato de sódio (SDS-PAGE):

No gel de concentração tinha-se 4% e no gel de migração, 15 % (p/v) de acrilamida.

Alguns testes realizados previamente mostraram que 15% de acrilamida, no gel de migração, era a melhor concentração para visualizar as bandas de proteínas presentes nas membranas nativa e hidrolisada.

Usou-se como padrão para calibração um kit contendo seis diferentes proteínas com peso molecular conhecido (*Low Molecular Weight Electrophoresis Calibration Kit*, Pharmacia Biotech), conforme a Tabela 21 .

TABELA 21 - Proteínas usadas para calibração em eletroforese SDS-PAGE

(Rennes, Maio de 1998)

Proteína	Peso Molecular (Daltons)
Fosforilase b	94.000
Albumina	67.000
Ovalbumina	43.000
Anidrase carbônica	30.000
Inibidor de tripsina	20.100
α -Lactoalbumina	14.400

a) Preparação das amostras

Preparou-se oito diferentes soluções de amostras (Tabela 22). As soluções 3-8 foram preparadas usando-se os produtos liofilizados obtidos após hidrólise enzimática da membrana.

TABELA 22 - Soluções de amostras preparadas para eletroforese SDS-PAGE

(Rennes, Maio de 1998.)

Nº	Amostra	Concentração (mg/ml*)
1	Sobrenadante da hidrólise pela flavourzyme (E/S = 5 %)	80
2	Sobrenadante da hidrólise pela flavourzyme (E/S = 5 %)	40
3	Membrana hidrolisada pela flavourzyme (E/S = 5 %)	80
4	Membrana hidrolisada pela flavourzyme (E/S = 5 %)	40
5	Membrana hidrolisada pela Pepsina (E/S = 2 %) + sobrenadante	80
6	Membrana hidrolisada pela Pepsina (E/S = 2 %) + sobrenadante	40
7	Membrana nativa	80
8	Membrana nativa	40

* dissolvidos em solução de desnaturação

Todas as soluções foram preparadas diluindo-se a respectiva amostra na solução de desnaturação (Tabela 23) e aquecendo-se em um banho-maria em ebulição durante 4 minutos (Itoh *et al.* 1987).

TABELA 23 - Solução de desnaturação para eletroforese SDS-PAGE

(Rennes, Maio de 1998)

Composto	Volume (ml)
Água destilada	3.0
tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.0
Glicerol	1.6
SDS 10 %	1.6
β - mercaptoetanol	0.4
Azul de bromofenol 0.5 % (em água)	0.4

b) Eletroforese SDS-PAGE

Injetou-se 10 μ l de cada solução, sobre o gel de concentração, em suas respectivas câmaras.

A eletroforese foi realizada em um sistema Mini-PROTEAN II *Electrophoresis Cell* conectado a um gerador de tensão Pharmacia LKB.EPS 500/400, a uma tensão constante de 200 V, durante 45 minutos; a composição da solução tampão utilizada é apresentada na Tabela 24.

TABELA 24 - Solução tampão utilizada para eletroforese SDS-PAGE

(Rennes, Maio de 1998)

Composto	Massa (g)
Tris-base	9,0
Glicina	43,2
SDS	3,0
Água destilada	até completar 600 ml

O gel foi revelado por imersão na solução de coloração (Tabela 25) e descolorido usando-se uma solução de ácido acético e etanol em água (4:1:5) (Itoh *et al.* 1987).

TABELA 25 - Solução de coloração para eletroforese SDS-PAGE

Composto	Composição
Azul de Coomassie R 250	1 g
Ácido Tricloroacético (TCA)	125 g
Metanol	½ l
Água destilada	1 l

2.3.4. Composição em amino ácidos da membrana nativa e dos produtos de hidrólise

As composições em AA da membrana nativa e no sobrenadante da membrana hidrolisada foram determinadas seguindo-se o método de Spackman *et al.* (1958), com o auxílio de um sistema Pharmacia LKB (Alpha Plus), Pharmacia, Orsay (91), França.

Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as amostras foram hidrolisadas usando-se uma solução de HCl 6 N; pesou-se inicialmente 10 mg de cada amostra liofilizada e a hidrólise foi feita sob vácuo à 110°C, em três diferentes tempos: 24, 48 e 96 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. TEOR DE PROTEÍNAS NA MEMBRANA NATIVA

O teor de proteínas na membrana nativa foi analisado pelo método oficial Kjeldahl e o valor médio obtido foi de **81.26 %**.

3.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA MEMBRANA

3.2.1. Cinética da hidrólise pela pepsina

A hidrólise foi realizada a uma taxa $E/S = 2 \%$ (p/p). A DO foi lida em espectrofotômetro a 280 nm (Figura 12).

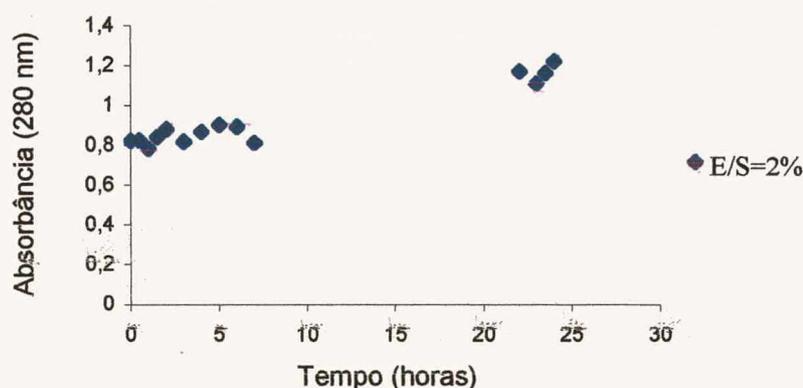


FIGURA 12 – Valores de DO durante a hidrólise de membrana pela pepsina (280 nm)

3.2.2. Cinética da hidrólise pela flavourzyme

A hidrólise foi feita a duas taxas diferentes: $E/S = 2 \%$ e $E/S = 5 \%$ (p/p).

Analisando-se a curva de DO obtida para cada caso (Figura 13), observa-se que um aumento na razão E/S resultou em uma maior solubilização da membrana.

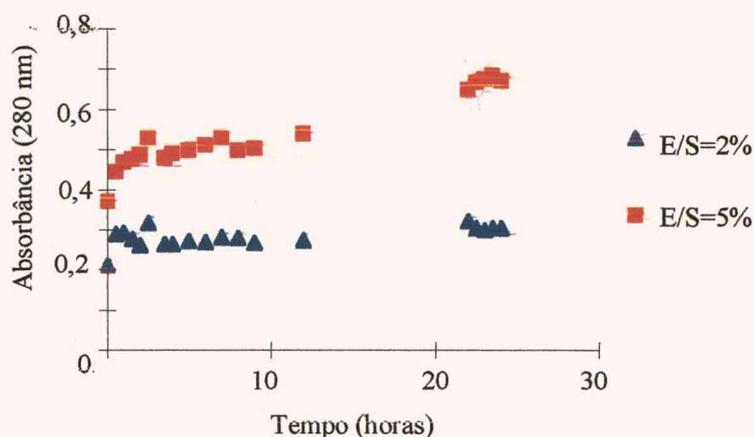


FIGURA 13 – Valores de DO durante a hidrólise da membrana pela flavourzima (280 nm)

3.3. CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA E DOS PRODUTOS DA HIDRÓLISE

3.3.1. Estudo de solubilização da membrana nativa

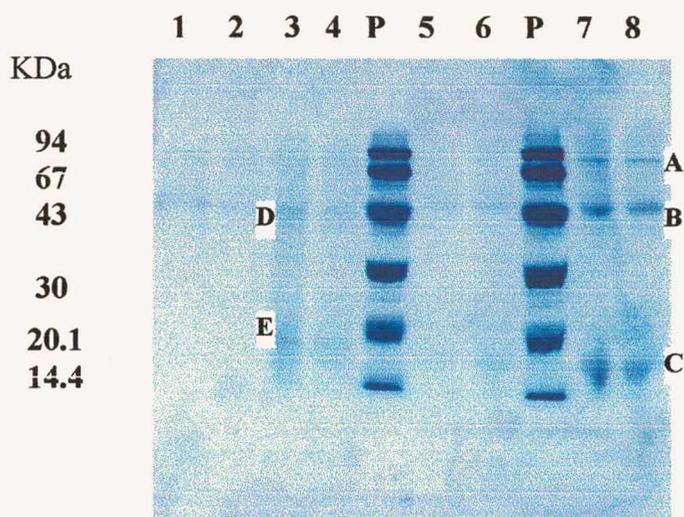
Antes do uso de SDS 10 % e β -Mercaptoetanol 0.5 M, o único tratamento que resultou em uma completa solubilização da membrana foi aquele usando-se NaOH 4 N à 37°C durante 4 horas; depois deste tempo de tratamento, obteve-se uma solução cristalina, sem qualquer turvação ou decantação de resíduos da membrana.

Após o tratamento com SDS 10 % e β -Mercaptoetanol 0.5 M, obteve-se uma solubilização total da membrana apenas quando usou-se NaOH 2 N à 37°C durante 4 horas (menos drástico que o anterior); depois deste tempo de tratamento, obteve-se uma solução cristalina, sem nenhuma turvação ou decantação.

O tratamento com NaOH, 4 N à 37°C durante 4 horas foi o único tratamento que resultou em uma solubilização total da membrana mas, nestas condições tão drásticas pode-se ter causado alguma degradação na estrutura das proteínas, o que resultaria na liberação de pequenas moléculas de peptídeos, as quais não podem ser detectadas, durante a eletroforese (devido ao seu peso molecular muito baixo, não ficam retidas no gel de migração).

3.3.2. Caracterização da membrana nativa e dos produtos de hidrólise por eletroforese em gel de poli-acrilamida (PAGE) em presença de dodecilsulfonato de sódio (SDS) (Laemmli *et Favre*, 1973).

O perfil eletroforético SDS-PAGE (15 %) da membrana nativa e hidrolisada por enzimas é apresentado na Figura 14.



- 1 Sobrenadante da hidrólise da membrana pela flavourzyme (80 mg/ml)
- 2 Sobrenadante da hidrólise da membrana pela flavourzyme (40 mg/ml)
- 3 Membrana hidrolisada pela flavourzyme (80 mg/ml)
- 4 Membrana hidrolisada pela flavourzyme (40 mg/ml)
- 5 Membrana hidrolisada pela pepsina (80 mg/ml)
- 6 Membrana hidrolisada pela pepsina (40 mg/ml)
- 7 Membrana nativa (80 mg/ml)
- 8 Membrana nativa (40 mg/ml)
- P Padrão do kit de proteínas (peso molecular expresso em K Daltons)

FIGURA 14 - Perfil eletroforético SDS-PAGE (15%) da membrana da casca

Analisando este perfil, três bandas principais (A, B e C) podem ser visualizadas nas linhas de migração da membrana nativa (linhas 7 e 8) e duas outras bandas (D e E) podem ser visualizadas nas linhas da membrana hidrolisada pela flavourzyme (linhas 3 e 4).

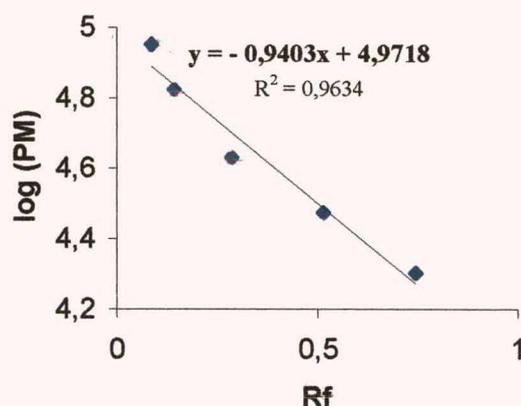


FIGURA 15 - Curva de calibração com proteínas do do kit de PM padrão

Usando-se a equação da curva obtida (Figura 15), calcula-se o peso molecular (PM) das proteínas da casca (Tabela 26), após obter-se o R_f de cada banda; o R_f é calculado pelo quociente entre a distância percorrida e a distância total até o *front* (linha de migração)

TABELA 26 - PM das proteínas identificadas por SDS-PAGE nas membranas da casca (Rennes, Maio de 1998)

Banda	Peso Molecular (Daltons)
A	73.200
B	50.400
C	13.000
D	50.400
E	17.600

Analisando-se o perfil eletroforético das membranas da casca (Figura 8), foram identificadas três bandas nas linhas de migração da membrana nativa: A (73,2 kDa), B(50,4 kDa) e C (13 kDa); Nys *et al.* (1998) e Hincke *et al.* (1997) obtiveram resultados semelhantes fazendo-se SDS-PAGE na matriz orgânica da casca de ovo, identificando as seguintes proteínas: Lisozima (14,3 kDa), Ovocleidina-17 (17 kDa), Ovalbumina (45 kDa) e Ovotransferrina (77 kDa).

3.3.3. Composição em amino ácidos na membrana da casca nativa e hidrolisada

Os resultados da análise de AA nas membranas, são apresentados na Tabela 27.

TABELA 27 - Resultado da análise de AA nas membranas da casca
(Rennes, Maio de 1998)

Amino Ácido	Membrana nativa (%)	Membrana hidrolisada (%)
Asp	6,6	7,0
Thr	5,5	5,8
Ser	5,5	5,7
Glu	8,9	8,9
Pro	13,9	8,4
Gly	8,5	9,0
Ala	3,5	3,4
Cys	9,5	9,2
Val	6,6	7,3
Met	2,5	2,9
Ile	3,0	3,2
Leu	4,0	4,2
Tyr	1,4	1,3
Phe	1,2	1,3
His	3,0	3,1
Lys	2,7	2,7
NH ₃	9,5	11,8
Arg	4,3	4,6
Trp	ND	ND

Trp : não determinado (ND)

Analisando-se a Tabela 27 observa-se que os principais AA presentes na membrana nativa são prolina, cisteína e NH₃; estes dados estão de acordo com Leach (1982), o qual apresenta cisteína (10,8 %) e prolina (9,8 %), como sendo os principais AA presentes nas membranas da casca de ovo.

CONCLUSÕES

E

PERSPECTIVAS

Frente aos resultados apresentados, conclui-se que:

- O tratamento mais adequado da casca para obtenção de um sal de cálcio foi aquele feito com o ácido cítrico.
- Considerando-se que o citrato de cálcio obtido não atende às especificações estabelecidas pela legislação com relação à carga microbiana, deve-se incluir no processo uma etapa de pasteurização ou esterilização do produto final.
- Deve-se realizar ensaios para determinar-se a digestibilidade do citrato de cálcio e compará-la com a do carbonato de cálcio.
- Todos os tratamentos aplicados para reduzir o teor de proteínas da casca apresentaram diferenças estatísticas entre si, sendo que o tratamento de hidrólise enzimática associada com branqueamento foi o que apresentou melhores resultados.
- A purificação dos minerais da casca resultou em uma redução no índice de rejeição desta nos implantes ósseos porém, a casca ainda não apresentou capacidade de induzir à formação de osso; novos implantes devem ser realizados com este objetivo.
- Obteve-se diferenças no teor de aminoácidos na membrana nativa e após hidrólise pela flavourzima, comprovando-se a atividade proteolítica da enzima, sendo que os principais aminoácidos encontrados na membrana nativa foram prolina, cisteína e NH_3 .
- Além das alternativas apresentadas, pode-se ter ainda outras formas de valorização das cascas: material-base para a síntese da hidroxiapatita, uma biocerâmica amplamente utilizada em próteses dentárias e ósseas; o CaCO_3 pode ser usado como fundente para ligas metálicas raras, ou em cosmetologia, como tópico, sendo um bom absorvente de líquidos e gorduras.

- Apresentou-se diferentes alternativas para valorização das cascas de ovos; considerando-se o custo para o descarte destas cascas (por exemplo, R\$ 50,00 na França), e o fato de não ter-se despesas com moagem, transporte e outros, pode-se agregar valor a estas cascas, apresentando assim um grande valor econômico em potencial.

- Deve-se considerar também os aspectos ambientais envolvidos na valorização das cascas de ovos pois, além de diminuir-se o problema de poluição quando estas são descartadas diretamente no meio ambiente contendo um teor considerável de proteínas, o uso destas cascas como uma fonte alternativa de CaCO_3 pode diminuir o impacto sobre as reservas naturais de rocha calcária, uma fonte natural não renovável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Arlington.1992. 1141 p.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the microbiological examination of foods**. 3rd ed. 1992.

ARIAS, J.I. *et al.* Partial biochemical and immuno chemical characterization of avian egg shell extracellular matrices. **Arch. Biochem. and Biophys.** v. 298, p. 293-302, 1992.

_____, NAKAMURA, O., FERNANDEZ, M.S., Wu, J.J., KNIGGE, P., EYRE, D.R. and CAPLAN, A.I. Role of Type X collagen on experimental mineralization of eggshell membranes. **Connect. Tiss. Res.** v. 36, p.21-33, 1997.

ARRUDA, N.B. **Metabolismo do cálcio e fósforo**. CCB, UFSC, Florianópolis. 20 p. 1995. (Mimeogr.).

BAKER, R. A. *et al.* Calcium supplementation and processing variable effects on orange juice quality. **Journal of Food Science**, v. 56, n.5, p. 1369-1371, 1991.

BARTHOLOMAI, A. **Fábricas de alimentos. Processos, equipamentos, custos**. Ed. Acribia S. A., Zaragoza.1991.

BLUMENTHAL, D. *Salmonella enteritidis*: From the Chicken to Egg. **FDA Consumer**. April 17th, 1990.

BOBBIO, P.A. & BOBBIO, F.O. **Introdução à química de alimentos**. 2^a. ed. Livraria Varela, S.P. 1989.

_____. **Química do processamento de alimentos**. 2^a. ed. Livraria Varela, S.P. 1992.

BONADEO, I. **Tratado de cosmética moderna**. Ed. Científico-Médica. Barcelona. 1963.

- BRAKE, J. *et al.* Egg handling and storage. **Poultry Science**. v.76, p.144-151, 1997.
- BRASIL. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NB-66. **Referências bibliográficas**. Rio de Janeiro, Maio, 1989, 9 p.
- _____. Portaria nº 451, de 19 de Setembro de 1997. Estabelece princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**. Brasília. nº 124-E, p.4-13, 2 de Julho de 1998. Seção 1.
- BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clin. Orthop.** v. 174. p. 28-42, 1983.
- BURLEY, R. W. & VADEHRA, D. V. **The avian egg : chemistry and biology**. John Wiley and Sons, New York, N.Y. p. 68-71, 1989.
- CHEFTEL, J. C., CUQ, J. L. e LORENT, D. **Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propriedades funcionais. Valor nutritivo. Modificações químicas**. Ed. Acribia S. A., Zaragoza . p. 167-177. 1989.
- CHOWDHURY, S.D. Shell membrane protein system in relation to lathrogen toxicity and copper deficiency. **World's Poultry Science Journal**. v. 46, p. 153-169, 1990.
- DAWSON-HUGHES, B, DALLAS, G.F, KRAIJI, G.F. A controlled trial of the effect of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. **N. Engl. J. Med.** v. 323. p. 878-883, 1990.
- DE FRANCISCO, A. Combined fluorescence and scanning electron microscopy: A technique for interchange able examination of one specimen with two microscopes. In: MUNCK, L. **Fluorescence analysis in foods**. New York: Longman Scientific and Technical, p. 125-130, 1989.

DUPOIRIEUX, L., POURQUIER, D., SOUYRIS, F. Powdered eggshell: a pilot study on a new bone substitute for use in maxillofacial surgery. **J. of Cranio Maxillo-Facial Surgery**. v. 23, p. 187-194, 1995.

_____, NEVES, M.A., POURQUIER, D. The effect of two different space fillers used in combination with guided bone regeneration: an experimental study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. 1998. (unpublished data).

DURRANT, P.J. **Inorganic chemistry**. 3 ed. Longman Group Ltda. London. 1964. 788 p.

FONSECA, W. **Carne de ave e ovos. Vademecum**. 2^a ed. Ícone Editora Ltda. 1985.

FONSECA, A. & PRISTA, I.N. **Manual de terapêutica dermatológica e cosmetologia**. Ed. Roca. SP. 1984. 436 p.

FUJITA, T. *et al.* Heated oyster shell-seaweed calcium (AAA Ca) on osteoporosis. **Calcified Tissue Int.** v. 58, p. 226-230, 1996.

GAST, R.K. Detecting infections of chickens with *Salmonella pullorum* isolates using standard serological methods. **Poultry Science**. v.76, p.17-23, 1997.

GAUTRON, J., BAIN, M., SOLOMON, S., NYS, Y. Soluble matrix of hen's eggshell extracts changes *in vitro* the rate of calcium carbonate precipitation and crystal morphology. **British Poultry Science**. v. 37, p. 853-866, 1996.

_____, HINCKE, M.T., DOMINGUEZ-VERA, J.M., GARCIA-RUIZ, J.M. and NYS, Y. Ovotransferrin and Lysozyme are constituents of the hen eggshell matrix. In **Proceeding of the European poultry meat and egg quality symposium.**, eds. Kijoski, J., Pikul, J., Poznan, p. 172-181, 1997.

- GIORDANO, H., MACNEIL, J.H., OLVADIA, J. Como Rola o Futuro para o ovo e seus produtores. **Aves & Ovos**. p. 4-8, Julho, 1996. (Entrevista).
- GRANT, R. A. **Applied Protein Chemistry**. Applied Science Pub. Ltd., London. p. 69-85, 1980.
- GUERIN, C. Fractionnement et hydrolyse enzymatique de protéines du blanc d'œuf. **Thèse** Université de Rennes I. n. 610, 1991. 115 p.
- HINCKE, M.T., BERNARD, A.M., LEE, F.R., TSANG, C.P.W. and NARBITZ, R. Soluble protein constituents of the Domestic fowls eggshell. **British Poultry Science**. v. 33, p. 505-516, 1992.
- _____, TSANG, C.P.W., COURTNEY, M., HILL, V. and NARBITZ, R. Purification and Imunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (Ovocleidin 17) **Calcified Tissue Int**. v. 56, p. 578-583, 1995.
- ITOH, T., MYIAZAKI, J., SUGAWARA, H., ADACHI, S. Studies on the characterization of ovomucin and chalaza of hen's egg. **J. Food Sci**. v. 52, p. 1518-1521, 1987.
- KESHAVARZ, K. The effect of different levels of vitamin C and Cholecalciferol with adequate or marginal levels of dietary calcium on performance and eggshell quality of laying hens. **Poultry Science**, v.75, p. 1227-1235, 1996.
- KIM, Hyun-Man, REY, C., GLIMCHER, M.J. Isolation of calcium-phosphate crystals of bone by non-aqueous methods at low temperature. **J. of Bone and Mineral Research**. v. 10, p. 1589-1596, 1995.
- LABIN-GOLDSCHER, R. & EDELSTEIN, S. Calcium citrate : a revised look at calcium fortification. **Food Technology**, v. 50, n. 6, p. 96-98, 1996.

- LAEMLI, U.K., FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. 1. DNA packaging events. **J. Mol. Biol.** v. 80, p. 575-599, 1973.
- LEACH Jr., R.M. Biochemistry of the organic matrix of the eggshell. **Poultry Science.** v. 61, p. 2040-2047, 1982.
- LOPEZ, H.A., NOMURA, K. A ciência redescobre o ovo. **Aves & Ovos**, p. 12-16, Julho, 1996. (Entrevista).
- MIRANDA-PINTO, C.O.B., GOMES, T.A., OLIVEIRA, J.A.S. Emprego de raio-X na caracterização da hidróxiapatita sintetizada a partir de casca de ovo. VII Workshop Anual e Usuários do LNLS. Ed. European Journal of Mineralogy. **Anais.** v.3. 1996.
- MOREAU, S. Contribution a l'étude de la structure de l'ovomucine et de sa valorisation. **Thèse.** Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes. n. 96-30 / B / 79, 1996. 123 p.
- _____, NAU, F., PIOT, M., GUERIN, C., BRULE, G. Hydrolysis of henn egg white ovomucin. **Z. Lebensm Unters Forsch A.** v.205, p.329-334, 1997.
- NESS, M. R. and GERHARDY, H. Consumer Preferences for Quality and Freshness Attributes of Eggs. **British Food Journal.** v. 96, n. 3, p. 26-34, 1994.
- NOVOA, M.A.O., PALACIOS, C.A.M., LEÓN, E.R. **Manual de técnicas para laboratório de nutrición de peces y crustaceos.** FAO: México, D.F. Mayo, 1993.
- NYS, Y. **Régulation endocrinienne du métabolisme calcique chez la poule et calcification de la coquille.** Thèse de docteur de l'université Paris 6. 1990.

- _____, ZAWADZKI, J., GAUTRON, J. and MILLS, A.D. Whitening of brown-shelled eggs: Mineral composition of uterine fluid and rate of protoporphyrin deposition. **Poultry Science**. v. 70, p. 1236-1245, 1991.
- _____, HINCKE, M.T., ARIAS, J.L., GARCIA-RUIZ, J.M. and SOLOMON, S.F. Avian eggshell mineralization. 1998 (unpublished data).
- OKUDA, T. Proteínas em Cápsulas. **Avicultura Industrial**. p. 23-31. Fevereiro, 1996. (Entrevista).
- PARASKEVOPOULOU, A. & KIOSSEOGLOU, V. Cholesterol and other lipid extraction from egg yolk using organic solvents: effects on functional properties of yolk. **Journal of Food Science**. v. 59, n. 4, p. 766-768, 1994.
- PARSONS, A.H. Structure of eggshell. **Poultry Science**.v. 61, p. 2013-2021, 1982.
- PEEBLES, E.D., BRAKE, J., GILDERSLEEVE, R.P. Effects of eggshell cuticle removal and incubation humidity on embryonic development and hatchability of broilers. **Poultry Science**. v. 66, p. 834-840, 1987.
- PREGNOLATTO, W. & PREGNOLATTO, N.P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físicos e químicos para análise de alimentos**. V. 1. 3ª ed. Instituto Adolfo Lutz: São Paulo, SP. 1985.
- PUZO, D. P. How much Egg Risk ? **Los Angeles Times. Food**. p. 2, March 9th, 1995.
- REID, J. The use of plasma chemistry unit as an aid to the scanning electron microscope. Study of avian egg-shell structure. **British Poultry Science**.v. 24, p. 233-235, 1983.

- ROBINSON, D. S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Ed. Acribia S. A., Zaragoza. p.207-211, 1991.
- RODRIGUES, T. O inimigo número um. **Avicultura & Suinocultura Industrial**. p. 46-48. Março, 95. (Entrevista).
- ROLAND, D.A ., BRYANT, M.M. & RABON, H.W. Influence of calcium and environmental temperature on performance of first-cycle (phase 1) commercial Leghorns. **Poultry Science**. v. 75, p.62-68, 1996.
- SHELDON, B.W. & SCHUMAN, J.D. Thermal and biological treatments to control psychrotrophic pathogens. **Poultry Science**. v.75, p.1126-1132, 1996.
- SHREVE, R.N. & BRINK JR., J.A. **Indústrias de processos químicos**. 4ª ed. Ed. Guanabara Dois. RJ. 1980. 717 p.
- SILVA, S.B., MELLADO, M.M.S. Elaboração e avaliação de um biscoito de chocolate enriquecido com sangue bovino. **Vetor**. Editora da FURG, Rio Grande. v.6, p.51-61, 1996.
- SIMONS, P. C. M. **Ultrastructure of the eggshell and its physiological interpretation**. Center for Agriculture Publishing and Documentation. University of Wageningen, The Netherlands. 1971.
- SLOAN, A. E. & STIEDMANN, M. K. Food Fortification: From Public-Health Solution to Contemporary Demand. **Food Technology**, v. 50, n. 6, p. 100-109, 1996.
- SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H., MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino-acids. **Ann. Chem.** v. 30, p. 1190-1206, 1958.

STANLEY, V.G., WOLDESENBET, S., GRAY, C. Sensitivity of *Escherichia coli* O157:H7 strain 932 to selected anticoccidial drugs in broiler chicks. **Poultry Science**. v. 75, p.42-46, 1996.

SUTHERLIN, W. and BUFANO, N. Focus on: Egg Products. **Consumer Publications**. FSIS. USDA. Washington. December, 1995.

THAPON, J. L. et BOURGEOIS, C. M. **L'Oeuf et les Ovoproduits**. Lavoisier Technique et Documentation. Paris. 1994

TSUGAWA, N. *et al.* Bioavailability of calcium from calcium carbonate, DL-calcium lactate, L-calcium lactate, and powdered oyster shell calcium in vitamin D-deficient or -replete rats. **Biol. Pharm. Bull.** n. 18, v. 5, p. 677-682, 1995.

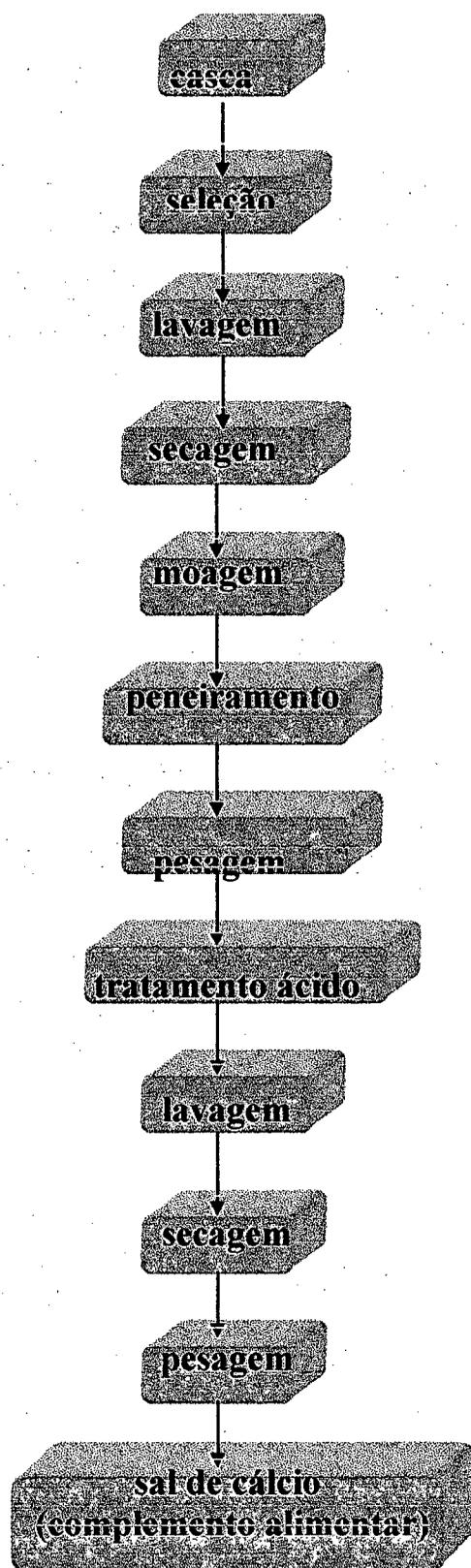
VICENZI, E. Melhor qualidade da casca do ovo. **Aves & Ovos**, p. 20-25, Julho, 1996. (Entrevista).

WEAST, R.C. **CRC Handbook of chemistry and physics**. 61st ed. Florida: CRC Press Inc. 1980.

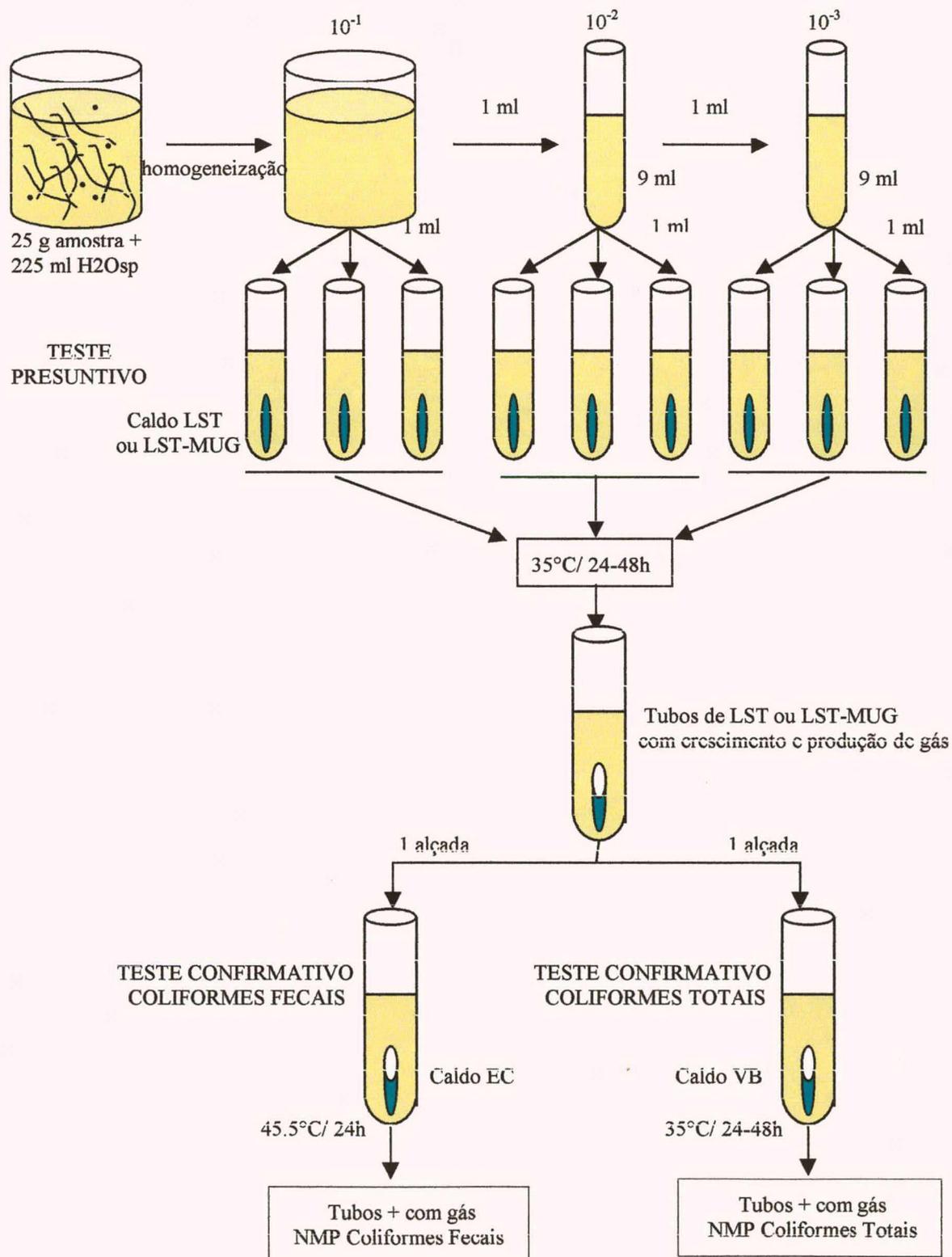
WHITAKER, J.R. & TANNENBAUM, S.R. **Food proteins**. AVI Pub. Company Inc. Connecticut. 1977. 599 p.

ANEXOS

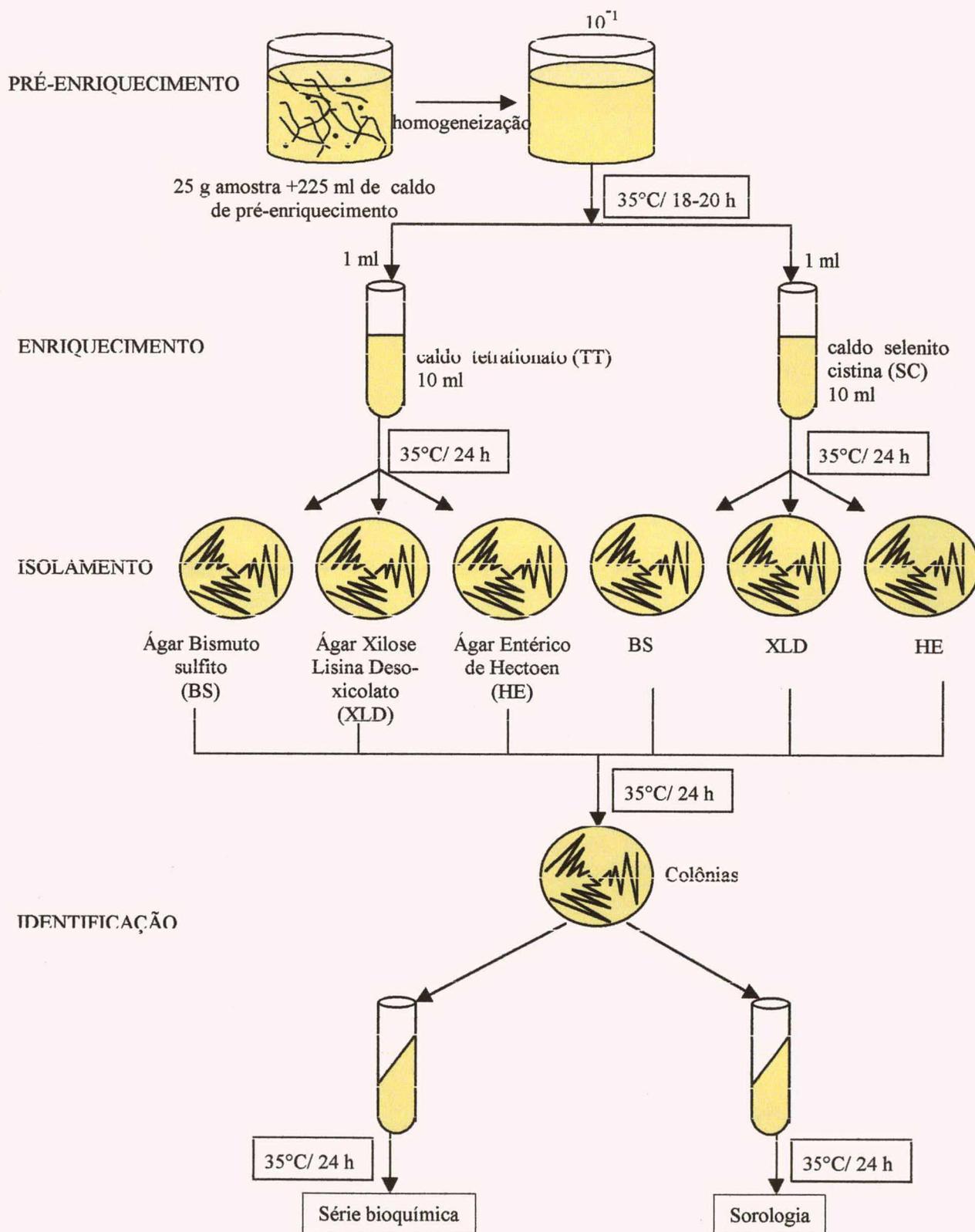
ANEXO 1 - Fluxograma de valorização da casca de ovo para uso como complemento alimentar



ANEXO 2 - Esquema de análise para contagem de coliformes totais e fecais pelo método do número mais provável (NMP) (APHA, 1992)



ANEXO 3 - Esquema de análise para detecção de *Salmonella spp* pelo método convencional (APHA, 1992)



ANEXO 4 – Tabela de Número Mais Provável e intervalo de confiança a nível de 95 % de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em séries de três tubos. Diluições : 0,01 – 0,001 e 0,0001 g ou ml (adaptado de APHA, 1992).

Combinações de tubos positivos	Série de 3 tubos NMP/g
0-0-0	< 30
0-0-1	30
0-1-0	30
0-2-0	-
1-0-0	40
1-0-1	70
1-1-0	70
1-1-1	110
1-2-0	110
2-0-0	90
2-0-1	140
2-1-0	150
2-1-1	200
2-2-0	210
2-2-1	280
2-3-0	-
3-0-0	230
3-0-1	390
3-0-2	640
3-1-0	430
3-1-1	750
3-1-2	1.200
3-2-0	930
3-2-1	1.500
3-2-2	2.100
3-3-0	2.400
3-3-1	4.600
3-3-2	11.000
3-3-3	≥ 24.000

ANEXO 5 – Principais elementos químicos presentes na casca de ovo *in natura*, identificados por DRX

