



Avaliação nutricional, em tilápias-do-nilo, de farinhas de sangue bovino obtidas por três métodos de processamento

Antonio Celso Pezzato¹, Wiliam Vicente Narváez-Solarte², Luiz Edivaldo Pezzato¹, Margarida Maria Barros¹, João Fernando Albers Koch³, Ademir Calvo Fernandes Junior³

¹ UNESP - Universidade Estadual Paulista - FMVZ - Campus Botucatu, São Paulo, 18618-000, CP 560.

² Departament de Salud Animal, Universidad de Caldas, Colombia.

³ Programa de Pós-graduação em Zootecnia, UNESP - Universidade Estadual Paulista - FMVZ - Campus Botucatu.

RESUMO - Avaliaram-se farinhas de sangue obtidas pelos métodos de processamento em tambor, convencional e atomização. As farinhas foram submetidas ao processo de extração e fracionamento da proteína para determinação do perfil do tamanho molecular, que foi comparado ao do sangue bovino *in natura*. Nas amostras, submetidas ou não ao processo de desengorduramento, foram realizadas análises da digestibilidade *in vitro* da proteína. Para determinação dos coeficientes de digestibilidade dos nutrientes *in vivo*, foram confeccionadas quatro rações, sendo uma sem farinha de sangue, denominada ração-referência purificada. Para essa etapa, juvenis de tilápia-do-nilo com peso médio inicial de 100,0±5,0 g foram estocados em aquários de 250 L, em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições e dez peixes/unidade experimental. As rações-teste foram obtidas com a introdução de 30% das farinhas de sangue em estudo. O processamento afetou a estrutura proteica original do sangue *in natura* em condições de alta temperatura e tempo prolongado, efeito traduzido pela alta proporção de peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres, correspondendo a baixos valores de digestibilidade da proteína da farinha de sangue nos testes *in vivo* e *in vitro*. A farinha de sangue atomizada e a de tambor são eficientemente utilizadas por tilápias-do-nilo. Na farinha de sangue convencional, a proteína teve valor biológico inferior ao das outras duas farinhas. Na formulação de rações contendo farinha de sangue para tilápias-do-nilo, a isoleucina deve ser considerada o primeiro aminoácido limitante, seguida pela metionina+cistina, arginina e treonina, que foram encontradas em níveis críticos para essa espécie, principalmente na farinha de sangue convencional.

Palavras-chave: aminoácidos, desnaturação, digestibilidade, farinha de sangue, proteína, *Oreochromis niloticus*

Nutritional evaluation, in Nile-tilapia, of bovine blood meals obtained by three processing methods

ABSTRACT - Three kinds of blood meal coming from different processing conditions (spray-dried, drum-dried and vat-dried blood meals) were evaluated. Protein extraction and fractionation were performed in each blood meal type to determine the molecular weight profile, which was compared with standard bovine blood *in natura*. *In vitro* digestibility analyses of the protein in the diets were carried out in samples, which underwent defatting process or not. The apparent digestibility coefficients of the blood meal *in vivo* nutrients was determined with the creation of four diets; one of them did not have blood meal, called purified reference diet. For this stage, Nile-tilapia juveniles, with 100.00±5.0 g/fish of average weight were stocked in tanks of 250 liters in a completely randomized blocks design with four replicates and 10 fish per experimental unit. The test diets were obtained with the introduction of 30% of the blood meals in the study. The protein structure of the blood *in natura* is affected by high temperature and length of time of processing, resulting in an increase in the amount of low molecular weight peptides, and free amino acids, corresponding to low values of blood meal protein digestibility, both *in-vivo* and *in-vitro* tests. Spray-dried blood meal and drum-dried blood meal are efficiently used by the Nile-tilapia. In the regular blood meal, protein has lower value than the two other blood meal types. At the development of diets containing blood meal for Nile-tilapia, isoleucine must be the first limiting amino acid, followed by methionine + cystine, arginine, and threonine, which were found in critical levels for this specie, mainly in the conventional blood meal.

Key Words: amino acids, blood meal, degradation, digestibility, *Oreochromis niloticus*, protein

Introdução

O produto da desidratação e secagem do sangue bovino nos abatedouros é denominado farinha de sangue. Segundo

Butolo (2002), no processo de obtenção da farinha de sangue, após a cocção, pode-se utilizar um dos seguintes métodos: tambor, *drum-drier* ou *roller-drier*; convencional, chama ou *vat-drier*; e atomização ou *spray-drier*.

Recebido em 6/5/2010 e aprovado em 23/8/2011.

Correspondências devem ser enviadas para: cpezzato@fmvz.unesp.br

A composição em aminoácidos dessas farinhas é similar (Doty, 1972) e igual à do produto original. No entanto, a digestibilidade da lisina e outros aminoácidos essenciais, quando determinada por bioensaios, difere amplamente entre os métodos de processamento (Ockerman & Hansen, 1988). Mesmo com essas variações, este subproduto tem sido utilizado como alimento proteico alternativo em rações à base de milho e farelo de soja na alimentação de suínos e aves, que têm a lisina como aminoácido limitante (Seerly, 1991).

Dependendo da fonte proteica, a desnaturação pelo calor ocorre a temperaturas de 25 a 100 °C (Hultin, 1986), pela perda das estruturas quaternária, terciária e secundária da proteína, enquanto a estrutura primária permanece intacta (Papadopoulos, 1989). Entretanto, o aquecimento excessivo e prolongado prejudica sua qualidade, danificando os aminoácidos arginina, cistina, lisina, serina e treonina (Shirley & Parson, 2000) e afetando a digestibilidade da proteína (Opstvedt et al., 1984). A melhoria nos processos de fabricação possibilitou aumentar sua inclusão nas dietas, por apresentar melhor uniformidade e alta digestibilidade, principalmente das farinhas de sangue atomizada e de tambor.

Sampaio et al. (2001), avaliando a digestibilidade em tilápias-do-nilo, determinaram os coeficientes de digestibilidade da matéria seca em 82,47 e 53,36%, proteína bruta em 97,33 e 50,69%, extrato etéreo em 52,22 e 89,36% e energia bruta em 74,97 e 57,97% nas farinhas de sangue atomizada e de tambor, respectivamente. Esses autores concluíram que a farinha de sangue atomizada é ótima fonte proteica para peixes tropicais, enquanto a farinha de sangue de tambor, por apresentar baixo coeficiente de digestibilidade da proteína bruta, não deve ser utilizada como fonte proteica de origem animal em rações para essa espécie.

Esta pesquisa foi realizada com os objetivos de avaliar o potencial das farinhas de sangue bovino atomizada, de tambor e convencional como parte integrante na dieta de tilápias-do-nilo e determinar o fracionamento proteico de cada ingrediente, assim como a digestibilidade de sua energia e dos nutrientes.

Material e Métodos

Este estudo foi desenvolvido na Unesp (Universidade Estadual Paulista), no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (AQUANUTRI) da FMVZ, Câmpus de Botucatu, laboratório associado ao Centro de Aquicultura da UNESP. Foram avaliadas farinhas de sangue bovino obtidas por três sistemas de processamento: atomização, secagem em tambor e em *vat drier*, também chamado processamento convencional.

As avaliações foram realizadas pelos métodos *in vitro* e *in vivo*. Amostras das três farinhas de sangue foram submetidas ao processo de extração e fracionamento da proteína para determinação do perfil do tamanho molecular, o qual foi comparado ao padrão obtido a partir de sangue bovino *in natura* da raça Canchim. A extração da proteína do sangue bovino (padrão) e das farinhas de sangue foi realizada no Laboratório de Eletroforese do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências – Unesp – Botucatu, São Paulo. Foram tomados 100 mg de amostra, que foram diluídos em 1,98 mL de solução fosfato (pH 7,3 0,05M) e 0,020 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%, posteriormente macerados, centrifugados durante 5 minutos a 7000 G. Posteriormente, coletou-se o sobrenadante como recomendado pela Amersham Pharmacia Biotech (1999). A seguir, no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Biociências da Unesp – Botucatu, São Paulo, elaborou-se a curva de calibração para o sangue de origem bovina. Uma alíquota do sobrenadante das amostras antes coletadas foi submetida ao fracionamento da proteína, de acordo com o peso molecular, em cromatógrafo AKTA, por meio de coluna de filtração HR 10/30, com diâmetro interno de 10 mm, produzida pela Amersham Pharmacia Biotech.

Nas amostras foram realizadas análises da digestibilidade *in vitro* da proteína, de acordo com o método descrito no Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (SINDIRAÇÕES/ANFAL, 2005), submetendo-se ou não ao processo de desengorduramento pelo método de Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente extrator, para posterior avaliação da qualidade da proteína e do efeito do método de análise.

Juvenis de tilápia-do-nilo com peso médio de 100,0±5,0 g foram submetidos aos tratamentos em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições e dez peixes por unidade experimental. Para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente, elaborou-se uma ração-referência purificada (INA, 1977) contendo 32% de proteína digestível (PD) e 3.600 kcal de energia digestível (ED/kg de ração), com base na proteína da albumina e gelatina (Tabela 1). As rações-teste foram formuladas de maneira que cada uma das farinhas de sangue substituísse 30% da ração purificada (Pezzato et al., 2002).

Na elaboração das rações, após pesagem e homogeneização dos ingredientes, foi acrescida água (55,0±2,0 °C) na proporção de 25% do peso total da mistura. A mistura foi peletizada e desidratada em estufa de ventilação forçada (50,0±1,0 °C) durante 24 horas. Após secagem, os peletes foram fracionados, obtendo-se grânulos com diâmetro médio de 4 mm.

Tabela 1 - Ração-referência (base na matéria natural) usada na determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína das farinhas de sangue pela tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*)

Ingrediente	%
Albumina	32,00
Gelatina	7,70
Amido	44,13
Óleo de soja	6,00
α - celulose	6,00
Fosfato bicálcico	3,00
Suplemento mineral e vitamínico ¹	0,50
Vitamina C	0,05
Sal comum	0,50
Butil-hidroxi-tolueno	0,02
Óxido de cromo-III	0,10
Composição químico-bromatológica ²	
Matéria seca (%)	92,34±0,01
Energia digestível (kcal/kg)	3630,35±72,7
Proteína bruta (%)	33,79±0,82
Proteína digestível (%)	32,33±0,07
Fibra bruta (%)	3,95±0,08
Extrato etéreo total (%)	6,36±0,17
Cálcio (%)	0,92±0,03
Fósforo total (%)	0,66±0,03
Arginina	1,98 (94,08) ³
Histidina	0,65 (93,54)
Isoleucina	1,36 (95,86)
Leucina	2,24 (96,00)
Lisina	1,80 (94,47)
Metionina	0,90 (94,30)
Metionina + cistina	1,50 (95,14)
Fenilalanina + tirosina	1,98 (95,89)
Treonina	1,18 (92,08)
Valina	1,87 (93,80)
Ácido aspártico	2,91 (94,36)
Ácido glutâmico	3,89 (95,65)
Alanina	2,07 (94,97)
Glicina	2,42 (94,21)
Serina	1,70 (94,86)
Prolina	1,86 (95,92)

¹ Suplemento vitamínico e mineral (*SupreMais*). Níveis de garantia por kg do produto: vit. A - 1.200.000 UI; vit. D3 - 200.000 UI; vit. E - 12.000 mg; vit. K3 - 2.400 mg; vit. B1 - 4.800 mg; vit. B2 - 4.800 mg; vit. B6 - 4.000 mg; vit. B12 - 4.800 mg; ácido fólico - 1.200 mg; pantotenato de cálcio - 12.000 mg; vit. C - 48.000 mg; biotina - 48 mg; colina - 65.000 mg; niacina - 24.000 mg; minerais: ferro - 10.000 mg; cobre - 600 mg; manganês - 4.000 mg; zinco - 3.0000 mg; iodo - 20 mg; cobalto - 2 mg; e selênio - 20 mg.

² Composição química e coeficientes de digestibilidade determinados nesta pesquisa.

³ Valores entre parênteses correspondem aos coeficientes de digestibilidade obtidos com tilápias.

Durante o período de alimentação, os peixes foram alojados em tanques-rede de formato circular (80 cm de diâmetro e 60 cm de altura) confeccionados em tela plástica (malha de 1,5 cm entre nós). Os tanques-rede foram alojados em aquários circulares de fibra de vidro com capacidade para 250 litros, num sistema fechado de circulação, com renovação total a cada 60 minutos, dotado de filtro físico e biológico, com aeração e controle automático para manutenção da temperatura na faixa de conforto para a espécie.

Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, às 8 h, 10 h e 12 h, e no período vespertino, em intervalos

de uma hora, iniciando-se às 14 h e encerrando às 17 h, uma hora antes da transferência para os aquários de coleta de fezes. Foram utilizadas oito gaiolas de alimentação distribuídas em dois grupos, de modo que, em cada um deles contivesse uma gaiola na qual os peixes foram alimentados com uma das dietas. Em dias alternados, eram submetidos aos quatro aquários de coleta de fezes para se obterem quatro repetições por tratamento e dar aos peixes um dia de descanso entre as coletas.

A coleta de fezes foi realizada em aquários de digestibilidade com capacidade para 300 litros e confeccionados em fibra de vidro. Os tanques-rede foram transferidos às 18 h e permaneceram até às 8 h do dia seguinte, conforme metodologia proposta por Pezzato et al. (2002). Os aquários de coleta tinham formato cônico no terço inferior e eram providos de registro acoplado hermeticamente a frasco transparente de 200 mL, utilizado para coleta das fezes. Às 8 h do dia seguinte, os tanques-rede retornavam para os aquários de alimentação, para novo ciclo. Após a retirada dos tanques-rede, por meio de centrifugação manual da água, as micropartículas presentes foram coletadas juntamente com o conteúdo já presente nos frascos coletores. Toda a água utilizada nos aquários de digestibilidade foi descartada e substituída para iniciar a coleta seguinte.

A temperatura e o oxigênio dissolvido da água dos aquários de digestibilidade e de alimentação foram mantidos por meio de aquecedores (26±2,12 °C) e pedra porosa acoplada a aerador central (5,5±0,89 mg/L), respectivamente. O nível de amônia foi monitorado e mantido abaixo de 0,02 mg/L, por meio de sifonagem e reposição de água.

As fezes coletadas foram congeladas a -20 °C, armazenadas e posteriormente desidratadas a 55,0 °C por 48 horas, retirando-se, com auxílio de lupa, as escamas do material obtido. Em seguida, as amostras foram moídas e homogeneizadas para as análises químicas. As análises químico-bromatológicas dos alimentos, das rações e das fezes foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do DMNA da FMVZ – UNESP – Botucatu e no Laboratório de Nutrição Animal da Agrocere - Nutrição Animal Ltda. – Rio Claro, São Paulo, seguindo os procedimentos descritos pela AOAC (2000). A determinação do conteúdo de aminoácidos foi realizada pela técnica HPLC, no Laboratório do Centro de Apoio Nutricional Adisseo Brasil Ltda, localizado em Paulínia, São Paulo.

Os coeficientes de digestibilidade aparente foram determinados pelo método indireto, usando-se óxido de cromo-III (Cr₂O₃) como indicador inerte (0,10% da ração). A determinação da concentração de Cr₂O₃ das rações e das fezes foi realizada a partir da mineralização com ácido nítrico

e perclórico e posterior quantificação do cromo no espectrofotômetro (Bremer et al., 2005). A análise de energia foi realizada em bomba calorimétrica (Parr Instrument, Moline-IL) no Laboratório de Química Analítica do Departamento de Química e Bioquímica da UNESP – Botucatu. O coeficiente de digestibilidade aparente foi calculado com base na fórmula descrita por Nose (1960), como segue:

$$Da_{(n)} = 100 - \left[100 \left(\frac{\%Cr_{2O_{3r}}}{\%Cr_{2O_{3f}}} \right) \times \left(\frac{\%N_f}{\%N_r} \right) \right]$$

em que: DA (n) = digestibilidade aparente; $Cr_{2O_{3r}}$ = % de óxido de crômio-III na ração; $Cr_{2O_{3f}}$ = % de óxido de crômio-III nas fezes; N_r = nutriente na ração; N_f = nutriente nas fezes.

O coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes de cada alimento foi calculado de acordo com a equação a seguir, proposta por Forster (1999):

$$CDAN_{ing.} = \frac{[(a+b)x CDAN_{mistura} - a x CDAN_{ref.}]}{b}$$

em que: $CDAN_{ing.}$ = coeficiente de digestibilidade aparente do nutriente pesquisado no alimento; $CDAN_{mistura}$ = coeficiente de digestibilidade aparente do nutriente na dieta misturada; $CDAN_{ref.}$ = coeficiente de digestibilidade aparente do nutriente na dieta referência; a = contribuição de nutriente da dieta-referência no teor do nutriente na dieta misturada; b = contribuição de nutriente do ingrediente-teste no teor do nutriente na dieta misturada; $a + b$ = teor de nutriente da dieta misturada.

Para a análise estatística, utilizou-se o procedimento GLM do SAS (*Statistical Analysis System*, versão 8.0). Os resultados foram submetidos à análise de variância e, quando observado efeito significativo, realizaram-se comparações múltiplas entre as médias dos tratamentos pelo teste Tukey, a 5% de significância. Os valores em porcentagem foram transformados pela expressão $y = \arcsen \sqrt{x/100}$, sendo x o valor da variável expresso em porcentagem.

Resultados e Discussão

Independentemente do processamento, as farinhas de sangue apresentaram concentração de ferro superior a 2.000 mg/kg na matéria natural e conteúdo de proteína bruta superior a 85%. O valor de proteína bruta da farinha de sangue convencional foi 7,57 e 6,71% inferior ao das farinhas de sangue obtidas por atomização e secagem em tambor, respectivamente (Tabela 2). A farinha de sangue atomizada foi a que apresentou o menor conteúdo de isoleucina, na ordem de 0,24%, seguida pela farinha de sangue seca em

tambor e pela convencional, com 0,74 e 0,76%, respectivamente. Os aminoácidos metionina + cistina se apresentaram em baixa concentração, com valores de 1,95; 2,33 e 1,89% para as farinhas de sangue atomizada, seca em tambor e convencional, respectivamente. Donkoh et al. (1999) verificaram que a farinha de sangue, mesmo processada a temperaturas entre 35 e 60 °C, apresentou baixos níveis de isoleucina (0,85% na matéria seca) e de aminoácidos sulfurosos (2,12% na matéria seca).

As farinhas de sangue caracterizam-se pelo alto conteúdo dos aminoácidos leucina e lisina, como relatado por Kirby et al. (1978), e inadequada relação leucina/isoleucina, com valores de 54,25:1; 17,04:1 e 16:46 nas farinhas de sangue atomizada, seca em tambor e convencional, respectivamente, enquanto na ração-referência essa relação foi da ordem de 1,64:1 e, na composição de carcaça, segundo Furuya (2000), é de 1,14:1. À exceção da isoleucina, cistina e metionina nas farinhas de sangue, os aminoácidos se apresentaram em quantidades muito superiores às contidas na ração-referência e na carcaça de tilápias, segundo Furuya (2000).

As diferenças na composição das farinhas de sangue sugerem que, além da variabilidade na matéria prima utilizada, durante o processamento, ocorrem reações devidas à temperatura, umidade, tempo de processamento, pH e reagentes presentes, como água, lipídeos e carboidratos. Segundo Hultin (1986), dependendo da fonte proteica, a desnaturação por calor ocorre a temperaturas de 25 a 100 °C, que caracteriza perda das estruturas quaternária, terciária e secundária da proteína, enquanto a estrutura primária permanece intacta. Papadopoulos (1989) constatou que os aminoácidos fenilalanina, metionina+cistina e prolina tiveram fácil degradação durante o calor excessivo de processamento em comparação aos demais aminoácidos e concluíram que o dano às proteínas pelo calor durante o processamento é provocado pelo reagente presente, além da temperatura, do tempo, da umidade e das substâncias redutoras.

Em contrapartida, neste estudo a composição em aminoácidos comprovou que as temperaturas e os tempos mais severos que normalmente ocorrem no processamento da farinha de sangue convencional não provocaram alterações na composição do perfil de aminoácidos das farinhas. Esse resultado não evidenciou mudança estrutural da proteína, embora Evangelista (2001) tenha associado a mudança estrutural à alteração na composição aminoacídica.

No sangue bovino fresco, houve um pico em 9 mL de eluição (PM 26894 dalton) que corresponde à hemoglobina com peso aproximado de 45.000 daltons. Na leitura do fracionamento, não se observaram moléculas com peso molecular inferior a 18854 daltons e isso indica que as

Tabela 2 - Composição químico-bromatológica, energética e aminoacídica, com base na matéria natural, de farinhas de sangue bovino obtidas pelos processamentos por atomização, secagem em tambor e convencional

Nutriente	Método de processamento da farinha de sangue		
	Atomização	Secagem em tambor	Convencional
Matéria seca (%)	93,67±0,11	93,28±0,07	93,48±0,01
Energia bruta (kcal/kg)	5433,11	5437,74	5725,83
Proteína bruta (%)	92,60±0,79	91,75±0,94	85,59±0,30
Fibra bruta (%)	0,56±0,02	0,68±0,09	0,72±0,04
Extrato etéreo (%)	0,65±0,06	0,50±0,12	0,60±0,06
Cálcio (%)	0,18±0,01	0,19±0,00	0,27±0,02
Fósforo (%)	0,20±0,02	0,18±0,01	0,32±0,01
Potássio (mg/kg)	3535,00±4,08	1211,50±0,00	1904,00±5,89
Cobre (mg/kg)	23,15±0,74	9,37±0,67	10,25±0,40
Ferro (mg/kg)	2511,25±82,42	2108±1,93	2045,25±90,85
Zinco (mg/kg)	30,25±0,82	17,83±0,39	27,73±0,55
Manganês (mg/kg)	7,30±0,38	12,75±0,66	9,35±0,19
Aminoácido			
Arginina	3,58	4,00	3,96
Histidina	5,64	5,23	4,45
Isoleucina	0,24	0,74	0,76
Leucina	13,02	12,61	12,49
Lisina	8,58	8,88	8,45
Metionina	1,32	1,29	1,05
Metionina + cistina	1,95	2,33	1,89
Fenilalanina + tirosina	9,65	9,99	9,91
Treonina	3,75	4,11	4,61
Valina	7,96	7,97	7,60
Asparagina	11,47	11,30	10,79
Glutamina	7,73	8,93	9,06
Alanina	8,03	7,58	7,52
Cistina	0,63	1,04	0,84
Glicina	4,14	4,05	4,07
Serina	4,69	5,05	5,23
Prolina	3,19	3,65	3,83

Médias de quatro repetições.

proteínas estavam íntegras. A farinha de sangue atomizada apresentou as proteínas íntegras, similares às do sangue fresco, com picos entre 8 mL (PM 38619 dalton) e 9 mL (PM 26894 dalton) de eluição, majoritariamente. A farinha de sangue obtida pelo processamento em tambor apresentou um segundo pico majoritário em 11 mL de eluição (PM 13173 Dalton), comprovando grau de degradação, mas não apresentando leituras em 15 mL (PM 3140 Dalton) e 16 mL (PM 2194 Dalton), que corresponderiam a pequenos peptídeos e aminoácidos. A farinha de sangue convencional foi a que apresentou maior degradação proteica. Em relação ao controle, não apresentou picos entre 9 e 12 mL de eluição, mas, entre os picos 16 mL (PM 2194 Dalton), 17 mL (PM 1533 Dalton) e 19 mL (PM 748 Dalton) de eluição, caracterizando abundância de peptídeos de baixo peso molecular, aminoácidos livres e quelatos, possivelmente em virtude da combinação do drástico processamento (altas temperaturas e tempo prolongado).

Na farinha de sangue atomizada, a estrutura da proteína do sangue manteve-se com características semelhantes às do produto *in natura*, seguida pela farinha obtida no

processamento de tambor, a qual, embora tenha mantido alto grau de integridade proteica em relação ao sangue *in natura*, apresentou certo grau de desnaturação. Estes resultados estão relacionados ao fato de a hemoglobina ser a proteína mais abundante no sangue e apresentar alta susceptibilidade a danos por calor prolongado.

Em análise da digestibilidade *in vitro* da proteína das farinhas em pepsina a 0,0002%, observou-se diferença ($P \leq 0,05$) entre as farinhas avaliadas com e sem desengorduramento (Tabela 3). A digestibilidade em pepsina da farinha de sangue atomizada foi superior à da farinha seca em tambor e daquela obtida por processamento convencional, as quais diferiram entre si somente quando não houve desengorduramento. Isso pode estar correlacionado ao fato de que, nas farinhas de sangue atomizada e seca em tambor, ocorreram as menores desnaturações de proteína, em decorrência dos maiores valores de digestibilidade dessas farinhas em comparação à farinha de sangue convencional. Embora o conteúdo de gordura nas farinhas de sangue seja baixo (Tabela 2), submeter as farinhas de sangue atomizada e seca em tambor a desengorduramento prévio à digestão

Tabela 3 - Digestibilidade *in vitro* da proteína de farinhas de sangue obtidas por três métodos de processamento, com e sem desengorduramento¹

Método de processamento	Desengordurada	Sem desengorduramento
Atomização	86,93±3,05aB	90,50±0,27aA
Secagem em tambor	64,63±2,02bB	73,38±3,05bA
Convencional	65,47±0,45bA	64,16±2,19cA

a,b,c Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem ($P \leq 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

A,B Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferem ($P \leq 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

¹ Digestibilidade em pepsina 0,0002%, média de seis repetições.

em pepsina reduziu em 3,94 e 11,92% ($P \leq 0,05$), respectivamente, o índice de digestibilidade *in vitro*, efeito não observado para a farinha de sangue convencional.

No fracionamento proteico, as farinhas de sangue atomizada e seca em tambor mantêm alta integridade das proteínas. Entre essas moléculas, encontram-se as lipoproteínas, compostos que, na presença de solventes orgânicos, são lixiviados, carregando as frações lipídica e proteica. Isso pode determinar diferença na solubilidade dessas farinhas, com e sem gordura, fato não observado para a farinha obtida por processamento convencional.

Em média, os aminoácidos da farinha de sangue atomizada apresentaram melhores coeficientes de digestibilidade ($P \leq 0,05$) em comparação aos da farinha de sangue seca em tambor, com diferença de 8,43%. A farinha de sangue convencional apresentou os piores ($P \leq 0,05$) coeficientes de digestibilidade em comparação às farinhas obtidas por atomização e secagem em tambor, com diferenças em média de 59,39 e 47,96%, respectivamente (Tabela 4). A farinha de sangue atomizada apresentou consistentemente altos coeficientes de digestibilidade aparente dos seus aminoácidos, com valores entre 97,75 e 94,09%, exceto da isoleucina, que foi de 71,69%.

Esses resultados estão de acordo com estudos prévios realizados por Bureau et al. (1999), que demonstraram em pesquisa com truta arco-íris que os aminoácidos da proteína da farinha de sangue atomizada foram quase totalmente digestíveis. Nesta pesquisa, a qualidade da proteína da farinha de sangue seca em tambor avaliada por meio da digestibilidade aparente dos aminoácidos foi inferior ($P \leq 0,05$) à da farinha atomizada, com valores entre 85,83 e 89,32%, exceto da isoleucina, cujo coeficiente foi o pior (65%). Cho & Slinger (1979), utilizando truta arco-íris, relataram que a farinha de sangue atomizada apresentou digestibilidade superior à da farinha seca em tambor, devido ao dano pelo calor durante o processamento, com efeito negativo sobre a digestibilidade da proteína.

O coeficiente médio de digestibilidade aparente dos aminoácidos da ração referência foi elevado para todos os aminoácidos, similar ao relatado por Furuya et al. (2001), de

que a albumina pode ser utilizada como substituto à caseína nos estudos de avaliação de nutrientes e que a associação com a gelatina proporciona adequado balanceamento de aminoácidos aos peixes. Os resultados deste estudo confirmaram melhor digestibilidade da farinha de sangue atomizada e, embora em menor grau, também da farinha de sangue seca em tambor, possivelmente em função do resultado de melhores práticas de processamento. Esses fatores associados melhoram o valor nutricional da proteína, deixando as cadeias aminoacídicas mais expostas, sem afetar a estrutura primária, que resulta num processo mais rápido de digestão enzimática (Camire, 1991). Por outro lado, também demonstram a eficiência natural da tilápia em digerir proteína animal de alto valor biológico, depois de adequado período de adaptação.

Os aminoácidos essenciais da proteína da farinha convencional apresentaram os piores coeficientes de digestibilidade, com valores entre 22,35 e 42,19%, enquanto os aminoácidos não-essenciais apresentaram coeficientes de digestibilidade aparente entre 40,00 e 45,95%. Entre os aminoácidos essenciais, a isoleucina foi o de menor digestibilidade, com 22,35%, seguida pela metionina, metionina+cistina e fenilalanina+tirosina, com 31,20; 35,47 e 35,22%, respectivamente. Entre os aminoácidos não-essenciais, a prolina apresentou o menor coeficiente de digestibilidade aparente (40,0%), seguida pelo ácido glutâmico (40,49%). A diferença entre a farinha de sangue convencional e as farinhas de sangue atomizada e seca em tambor é que a farinha de sangue convencional é elaborada submetendo o sangue a temperaturas altas durante tempo prolongado, dando origem a um produto de baixa uniformidade e alta desnaturação da proteína, a qual envolve sua estrutura primária, com o aumento de peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres.

Segundo Miller (1977), a maior desvantagem da farinha de sangue é a baixa digestibilidade de sua proteína, especialmente da lisina, uma vez que este aminoácido é o primeiro limitante em rações para tilápias. Isso pode ser confirmado na farinha obtida pelo método convencional, mas os resultados não divergem dos obtidos com as farinhas

Tabela 4 - Coeficientes de digestibilidade aparente em tilápias-do-nylo, em porcentagem da matéria seca (%), dos aminoácidos e da proteína digestível (%) e relação de aminoácidos essenciais:não-essenciais de farinhas de sangue obtidas por três métodos de processamento

	Método de processamento					
	Atomização		Secagem em tambor		Convencional	
Matéria seca	98,00a		95,43b		53,21c	
Energia	93,12a		91,74a		53,10b	
Proteína	94,36a		84,35b		44,07c	
Extrato etéreo	100,00a		100,00a		88,33b	
	Aminoácidos essenciais					
	Digestibilidade aparente (%)	Aminoácidos digestíveis (%)	Digestibilidade aparente (%)	Aminoácidos digestíveis (%)	Digestibilidade aparente (%)	Aminoácidos digestíveis (%)
Arginina	95,47a	3,42	88,36b	3,53	42,19c	1,67
Histidina	97,20a	5,48	88,89b	4,65	36,18c	1,61
Isoleucina	71,69a	0,17	65,00b	0,48	22,35c	0,17
Leucina	96,70a	12,59	87,27b	11,00	40,12c	5,01
Lisina	97,00a	8,32	89,83b	7,98	38,65c	3,26
Metionina	95,09a	1,26	85,88b	1,11	31,20c	0,32
Metionina + cistina	95,77a	1,87	85,81b	2,00	35,47c	0,67
Fenilalanina + tirosina	96,68a	9,33	87,39b	8,73	35,22c	3,49
Treonina	94,52a	3,54	86,15b	3,54	38,73c	1,78
Valina	96,03a	7,64	86,59b	6,90	36,19c	2,75
	Aminoácidos não-essenciais					
	Digestibilidade aparente (%)	Aminoácidos digestíveis (%)	Digestibilidade aparente (%)	Aminoácidos digestíveis (%)	Digestibilidade aparente (%)	Aminoácidos digestíveis (%)
Ácido aspártico	97,75a	11,21	89,32b	10,09	45,95c	4,96
Ácido glutâmico	95,02a	7,35	87,48b	7,81	40,77c	3,69
Alanina	95,86a	7,70	86,95b	6,59	41,05c	3,09
Glicina	94,48a	3,91	85,47b	3,46	40,49c	1,65
Serina	95,61a	4,48	87,66b	4,43	42,10c	2,20
Prolina	94,09a	3,00	86,02b	3,14	40,00c	1,53
Média	94,31±5,93		85,88±5,54		37,92±6,06	
Proteína digestível	88,34		81,33		37,72	
Relação aminoácidos essenciais:não-essenciais	58,17:41,83		57,88:42,12		54,38:45,62	

a,b,c Coeficientes de digestibilidade aparente seguidos por letras diferentes na mesma linha diferem ($P \leq 0,05$) pelo teste Tukey.

* Aminoácidos essenciais incluem cistina, tirosina sem triptofano.

obtidas por atomização e por secagem em tambor. Segundo Pickford (1992), os principais aminoácidos degradados em ingredientes de origem animal submetidos ao calor excessivo são arginina, cistina, lisina, serina e treonina. Bender (1978) relatou que os aminoácidos com radical reativo na sua cadeia, como a lisina, arginina, triptofano e histidina, podem se ligar a agentes redutores presentes no ingrediente, como observado na reação de *Maillard* entre a lisina e os açúcares redutores.

A isoleucina foi o aminoácido de pior digestibilidade nas três farinhas, com valores aproximadamente 31, 32 e 69% inferiores à digestibilidade média dos aminoácidos analisados nas farinhas de sangue obtidas por atomização, secagem em tambor e pelo método convencional, respectivamente. A baixa digestibilidade da isoleucina na farinha de sangue pode ter sido resultado da interação com a leucina e valina, como relatado por Allen & Baker (1972). Allan et al. (2000) verificaram baixa digestibilidade da isoleucina na farinha de sangue avaliada no peixe

australiano *Bidyanus bidyanus* e atribuíram esse fato ao desbalanço entre leucina e isoleucina.

Os aminoácidos sulfurosos metionina+cistina, com coeficiente de digestibilidade aparente de 35,47% na farinha de sangue convencional, reforçam o efeito negativo do calor excessivo sobre a proteína. A cistina é o aminoácido mais afetado pelo aumento na temperatura de processamento (Wang & Parson, 1998) e pela pressão exercida durante o mesmo (Shirley & Parson, 2000). Além disso, reage rapidamente durante o processamento com o calor para formar ligações dissulfeto entre as unidades de cistina (Bender, 1978). Conjuntamente com a maioria dos aminoácidos, a digestibilidade da cistina diminui pelo superaquecimento quando ocorrem reações de ligação cruzada entre as mesmas proteínas (Opstvedt et al., 1984; Ljokjel et al., 2000). A diminuição da digestibilidade da metionina+cistina também pode ocorrer quando esses dois aminoácidos são oxidados por meio de ligações não-peptídicas sulfidril (-SH) e bissulfeto (S-S), reações que ocorrem sempre que a metionina

e a cistina são expostas simultaneamente a severo tratamento térmico, baixa atividade de água e presença de ácidos graxos insaturados (Opstvedt et al., 1984).

Embora existam alguns aminoácidos mais susceptíveis ao dano por calor, os resultados confirmaram que existe ampla degradação, que pode ser verificada ao comparar as médias dos coeficientes de digestibilidade aparente de 94,31; 85,88 e 37,92% nas farinhas de sangue obtidas por atomização, secagem em tambor e pelo método convencional, respectivamente (Tabela 4). Neste sentido, Hurrell (1984) relatou que outra consequência negativa do calor é a possível racemização dos aminoácidos, com a perda da atividade biológica de alguns quando a forma biologicamente ativa levógiara é convertida na sua forma inativa destrógiara.

Os coeficientes de digestibilidade dos aminoácidos refletiram os coeficientes de digestibilidade da proteína das farinhas de sangue (Tabela 4). No entanto, a isoleucina apresentou coeficiente distante da média dos demais aminoácidos. Isso comprova a importância de se avaliar individualmente a digestibilidade dos aminoácidos, pois ainda que exista correlação entre os coeficientes de digestibilidade da proteína e a média dos aminoácidos, ocorrem variações entre aminoácidos que podem subestimar ou superestimar o valor aminoacídico do alimento.

Na composição de aminoácidos digestíveis (Tabela 4), o primeiro aminoácido essencial limitante nas farinhas de sangue foi a isoleucina, com deficiência de 86,92; 63,08 e

86,92% em relação ao nível presente na dieta referência (Tabela 1) para as farinhas obtidas por atomização, secagem em tambor e pelo método convencional, respectivamente, seguidas pela metionina+cistina e arginina, enquanto, entre os aminoácidos não-essenciais, destacaram-se as deficiências da prolina e glicina, principalmente na farinha de sangue obtida pelo método convencional. As relações aminoácidos essenciais:não-essenciais de 58,17:41,83; de 57,88:42,12 e de 54,38:45,62 encontradas para as farinhas obtidas por atomização, secagem em tambor e convencional, respectivamente, indicam balanceamento deficiente em relação à dieta-referência. Ao comparar essas relações à existente na carcaça de tilápia-do-nylo de 53,08 : 43,92 para aminoácidos essenciais e não-essenciais, respectivamente (Furuya, 2000), verificou-se que a farinha de sangue obtida pelo método convencional apresentou a relação mais próxima do perfil da carcaça, enquanto as farinhas processadas por atomização e secagem em tambor apresentaram maior proporção de aminoácidos essenciais. A maior diferença na relação lisina/arginina foi apresentada pela farinha de sangue obtida por atomização (Tabela 5), seguida pela farinha processada por secagem em tambor, enquanto a farinha convencional foi a que apresentou a relação mais próxima daquela com valor de 1,27, encontrado por Furuya (2000) na carcaça de tilápias-do-nylo. Assim, em rações com níveis elevados de farinha de sangue, os níveis de arginina e lisina devem ser considerados para evitar possíveis antagonismos.

Tabela 5 - Perfil de aminoácidos em relação à lisina (aminoácido/lisina x100) e índice relativo de comparação da ração-referência e das farinhas de sangue obtidas por três métodos de processamento e avaliadas em tilápias-do-nylo¹

Aminoácidos	Ração-referência	Método de processamento			
		Atomização	Secagem em tambor	Convencional	
Lisina	100,00	100,00	100,00	100,00	
Metionina	% lisina	50,00	15,14	13,91	9,82
	IRC	+61,70	-51,02	-55,01	-68,25
Metionina + cistina	% lisina	84,12	22,48	25,06	20,55
	IRC	+88,03	-49,76	-43,97	-35,11
Treonina	% lisina	64,12	42,55	44,36	54,60
	IRC	+9,50	-27,33	-24,23	-6,74
Arginina	% lisina	109,41	41,11	44,24	51,23
	IRC	+38,59	-47,93	-47,97	-35,11
Histidina	% lisina	35,88	65,87	58,27	49,36
	IRC	+33,03	+144,22	+116,06	+83,12
Isoleucina	% lisina	76,47	2,04	6,02	5,21
	IRC	+32,09	-96,47	-89,61	-90,99
Leucina	% lisina	126,47	151,32	137,84	153,68
	IRC	+27,31	+52,33	+38,76	+54,70
Fenilalanina	% lisina	82,53	84,38	77,32	85,58
	IRC	+74,23	+78,12	+63,22	+80,67
Fenilalanina + tirosina	% lisina	111,76	112,14	109,40	107,06
	IRC	+38,12	+38,58	+35,19	+32,30
Valina	% lisina	102,94	91,83	86,47	84,36
	IRC	+70,08	+51,70	+42,85	+39,36

IRC = índice relativo de comparação (ração-referência e ingredientes em relação à carcaça).

¹ Composição em aminoácidos da carcaça de tilápias-do-nylo determinada por Furuya (2000): lisina - 1,52%; metionina - 0,47%; metionina+cistina - 0,68%; treonina - 0,89%; arginina - 1,20%; histidina - 0,41%; isoleucina - 0,88%; leucina - 1,51%; fenilalanina - 0,72%; fenilalanina+tirosina - 0,89%; valina - 0,92%.

Os resultados comprovaram que a isoleucina, seguida pela metionina, arginina e treonina, foi o primeiro aminoácido limitante, tanto na farinha obtida por atomização como naquela obtida por secagem em tambor e na convencional (Tabela 5). Quando a principal fonte proteica é a farinha de sangue, a leucina pode representar de 5,01 a 12,59% dos aminoácidos digestíveis desse ingrediente, fato que pode levar a antagonismo com a isoleucina e valina (Allan et al., 2000).

Conclusões

O processamento convencional ou *vat-drier* afeta a estrutura proteica original do sangue *in natura*. A farinha de sangue obtida por atomização e a farinha de sangue seca em tambor são eficientemente utilizadas por tilápias-do-nylo, enquanto a farinha de sangue convencional apresenta proteína com valor biológico inferior. A isoleucina é o primeiro limitante na formulação de dietas para essa espécie com o uso de farinha de sangue, seguida pela metionina + cistina, arginina e treonina.

Referências

- ALLAN, G.L.; PARKINSON, S.; BOOTH, M.A. et al. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. **Aquaculture**, v.186, p.293-310, 2000.
- ALLEN, N.K.; BAKER, D.H. Quantitative efficacy of dietary isoleucine and valine for chick growth as influenced by variable quantities of excess dietary leucine. **Poultry Science**, v.51, p.1292-1298, 1972.
- AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. **Technical manual protein eletrophoresis**. Buckinghamshire, England: Amersham Place Little Chalfont, 1999. 76p.
- AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION - INA, Report of the american institute of nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. **Journal Nutrition**, v.107, p.1340-1348, 1977.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL - AOAC. **Official methods of analysis**, 17.ed. Gaithersburg, Maryland, USA, 2000. 3413p.
- BENDER, A.E. **Food processing and nutrition**. London: Academic Press, 1978. 243p.
- BREMER, N.H.; GRANER, C.A.F.; PEZZATO, L.E. et al. The spectrophotometric method on the routine of 1,5-diphenylcarbazine was adjusted on chromium determination in feces, after its utilization as a biological marker as chromium (III) oxide. **Ciência Rural**, v.25, n.3, p.691-697, 2005.
- BUREAU, D.P.; HARRIS, A.M.; CHO, C.Y. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.180, p.345-358, 1999.
- BUTOLO, J.E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2002. 438p.
- CAMIRE, M.E. Protein functionality modification by extrusion cooking. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.68, n.5, p.200-205, 1991.
- CHO, C.Y.; SLINGER, S.I. Apparent digestibility measurement in feedstuff for rainbow trout. In: WORLD SYMPOSIUM ON FINFISH NUTRITION AND FISHFEED TECHNOLOGY, 1979, Hamburg. **Proceedings...** Hamburg, 1979. p.239-247.
- DONKOH, A.; ATUAHENE, C.C.; ANANG, D.M. et al. Chemical composition of solar-dried blood meal and its effect com performance of broiler chickens. **Animal Feed Science Technology**, v.81, p.299-307, 1999.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2001. p.1913-1999.
- FORSTER, I. A note on the method of calculating digestibility coefficients of nutrients provided by single ingredients to feeds of aquatic animals. **Aquaculture Nutrition** (Short Communication), v.5, p.143-145, 1999.
- FURUYA, W.M. **Digestibilidade aparente de aminoácidos e substituição da proteína da farinha de peixe pela proteína do farelo de soja com base no conceito de proteína ideal em rações para a tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*)**. 2000. 69f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.
- FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; PEZZATO, A.C. et al. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para Tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1143-1149, 2001.
- HULTIN, H.O. Textural attributes of proteinaceous animal foods as influenced by reactions during food processing. In: FENNEMA, O.R.; CHANG, W.H.; LII, C.Y. (Eds.) **Role of chemistry in the quality of processed food**. Westport: Food and Nutrition Press, 1986. p.202-224.
- HURREL, R.F. Reactions of food proteins during processing and storage and their nutritional consequences. In: HUDSON, B.J.F. (Ed.) **Developments in food proteins - 3**. London: Elsevier, 1984. p.231-244.
- KIRBY, L.K.; NELSON, T.S.; JOHNSON, Z. et al. Content and digestibility by chicks of the amino acids in wheat, fish meal and animal by-products. **Nutrients Reports International**, v.18, n.5, p.591-597, 1978.
- LJOKJEL, K.; HARSTAD, O.M.; SKREDE, A. Effect of heat treatment of soybean meal and fish meal on amino acid digestibility in mink and dairy cows. **Animal Feed Science Technology**, v.84, p.83-95, 2000.
- MILLER, E.R. Formulating swine, poultry rations using flash-dried blood meal. **Feedstuffs**, v.18, n.16, p.22-23, 1977.
- NOSE, T. On the digestion of food protein by gold-fish (*Carassius auratus* L.) and rainbow trout (*Salmo irideus* G.). **Bulletin Freshwater Fisheries Research Laboratory**, v.10, p.11-22, 1960.
- OCKERMAN, H.W.; HANSEN, C.L. Blood utilization. In: OCKERMAN, H.W.; HANSEN, C.L. (Eds.) **Animal by product processing**. New York: VCH Publishing Company, 1988. p.232-255.
- OPSTVEDT, J.; MILLER, R.; HARDY, R. et al. Heat-induced changes in sulfhydryl groups and disulfide bonds in fish protein and their effect on protein and amino acid digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.32, p.929-935, 1984.
- PAPADOPOULOS, M.C. Effect of processing on high-protein feedstuffs: a review. **Biological Wastes**, v.29, p.123-138, 1989.
- PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M. et al. Digestibilidade de ingredientes pela tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1595-1604, 2002.
- PICKFORD, J.R. Effects of processing on the stability of heat labile nutrients in animal feeds. In: GARNSWORTHY, P.C.; HARESIGN, W.; COLE, D.J.A. (Eds.) **Recent advances in animal nutrition**. Melksham: Redwood Press, 1992. p.177-192.

- SAMPAIO, F.G.; HISANO, H.; YAMAKI, R.A. et al. Digestibilidade aparente das farinhas de peixe nacional e importada e das farinhas de sangue tostada e *spray-dried*, pela tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (L.). **Acta Scientiarum**, v.23, n.4, p.891-896, 2001.
- SEERLEY, R.W. Major feedstuffs used in swine diets. In: MILLER, E.R.; ULLREY, D.E.; LEWIS, A.J.J. (Eds.) **Swine nutrition**. 4.ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 1991. p.509-516.
- SHIRLEY R.B.; PARSON, C.M. Effect of pressure processing on amino acid digestibility of meat and bone meal for poultry. **Poultry Science**, v.79, p.1775-1781, 2000.
- SINDIRAÇÕES/ANFAL. **Compêndio brasileiro de alimentação animal**. 2.ed. Campinas: CBNA/SDR/MA, 2005. 371p.
- WANG, X.; PARSON, C.M. Effect of raw material source, processing system, and processing temperatures on amino acid digestibility of meat and bone meals. **Poultry Science**, v.77, p.834-841, 1998.