

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

CARACTERIZAÇÃO DO PLASMA SANGUÍNEO  
DE FRANGO, VISANDO A SUA UTILIZA-  
ÇÃO NA ALIMENTAÇÃO HUMANA.

M.T.  
M.Teresa Espinosa Del Rio de Reyes.  
Química Farmacéutica Bióloga

Orientador:

Dr. Spiros M. Constantinides

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e  
Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obten-  
ção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

- 1976 -

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Com amor:

À minha mãe

Aos meus irmãos:

Rafa e Fernando

Ao Santiago

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Visitante Dr. SPIROS M. CONSTANTINIDES do "Department of Food and Nutritional Science" e "Department of Biochemistry, Univ. of Rhode Island, Kingston, R.I., USA", pela entusiástica e dedicada orientação durante o desenvolvimento da parte experimental deste trabalho.

Ao Professor Doutor VALDEMIRO CARLOS SGARBIERI do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da UNICAMP, pela oportuna orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor AHMED A. EL-DASH, pela sua colaboração durante o desenvolvimento dos trabalhos de panificação.

Ao Professor Doutor FREDERICK CARL STRONG III, pela sua amizade e incentivo.

Ao Professor Doutor ANDRÉ TOSELLO, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola.

Ao Diretor da "Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana", M.S. RAFAEL M. ISLAS OJEDA.

Ao "CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA" do MÉXICO.

À Direção da Indústria Frango Soberbo.

À Srta. TELMA SILVIA T. ASSAD SALLUM pelo trabalho datilográfico.

## ÍNDICE

	página
ÍNDICE DE QUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMO	viii
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Generalidades sobre o sangue	3
2.2. O sangue como alimento humano	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Material	9
3.1.1. Amostra utilizada	9
3.1.2. Reagentes	9
3.1.3. Equipamentos	9
3.1.4. Animais usados na avaliação nutricional	10
3.1.5. Ingredientes usados na dieta para determinação de PER	10
3.1.6. Ingredientes para a elaboração de pão	10
3.2. Métodos	10
3.2.1. Preparação da amostra	10
3.2.2. Análises químicas	11
3.2.3. Estudo da solubilidade das proteínas do plasma liofilizado	12
3.2.3.1. Efeito do pH	12
3.2.3.2. Efeito de diferentes concentrações de cloreto de sódio	13

3.2.4. Conteúdo de proteínas tipo albuminas e globulinas no plasma	13
3.2.5. Determinação de aminoácidos	13
3.2.6. Determinação da digestibilidade "in vitro"	14
3.2.7. Isolamento das proteínas do plasma	15
3.2.8. Eletroforese das proteínas em gel de poliacrilamida	15
3.2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo uréia	16
3.2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS)	16
3.2.11. Eletrofocalização em gel	16
3.2.12. Avaliação nutricional de plasma dializado e não dializado	16
3.2.13. Preparo das dietas	17
3.2.14. Efeito de diferentes concentrações do plasma dializado e não dializado na elaboração de pão	20
3.2.14.1. Teste de panificação	21
3.2.14.2. Avaliação da qualidade do pão	21
3.2.15. Avaliação nutricional do pão elaborado com diferentes concentrações de plasma	21
3.2.16. Preparação do pão para incorporação às dietas	22
3.2.17. Preparo das dietas de pão para os ensaios biológicos	22

	página
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Obtenção da amostra	23
4.2. Análises químicas	24
4.3. Estudo da solubilidade das proteínas do plasma liofilizado	25
4.3.1. Efeito do pH	25
4.3.2. Efeito de diferentes concentrações de NaCl	25
4.4. Conteúdo de proteínas tipo albuminas e globulinas na proteína do plasma	29
4.5. Determinação de aminoácidos no plasma	29
4.6. Digestibilidade enzimática "in vitro"	32
4.7. Isolamento das proteínas do plasma	32
4.8. Conteúdo de aminoácidos na proteína isolada	36
4.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida	39
4.10. Eletroforese em gel contendo uréia	40
4.11. Eletroforese em gel contendo Dodecil sulfato de sódio	41
4.12. Eletrofocalização em gel	45
4.13. Avaliação nutricional do plasma dializado e não dializado	46
4.14. Efeito de diferentes concentrações de plasma dializado ou não dializado na elaboração e na qualidade do pão	51
4.15. Avaliação da qualidade do pão	54
4.16. Avaliação nutricional do pão elaborado com plasma dializado	58
5. CONCLUSÕES	63
6. BIBLIOGRAFIA	65

## ÍNDICE DE QUADROS

	página
QUADRO 1. Composição das dietas utilizadas para a determinação do PER.	17
QUADRO 2. Composição da mistura salina usada nas dietas.	18
QUADRO 3. Composição da mistura vitamínica.	19
QUADRO 4. Formulação da massa para panificação	20
QUADRO 5. Composição química do plasma liofilizado.	24
QUADRO 6. Composição em aminoácidos das proteínas contidas no plasma.	30
QUADRO 7. Digestibilidade da proteína do plasma.	32
QUADRO 8. Porcentagem de recuperação no isolamento da proteína.	35
QUADRO 9. Composição em aminoácidos da proteína isolada, do plasma dializado e da referência da F.A.O.	37
QUADRO 10. Determinação de peso molecular em SDS-poliacrilamida, das subunidades da proteína do plasma.	44
QUADRO 11. Ponto isoelétrico dos componentes do plasma obtidos por eletrofocalização em gel.	46
QUADRO 12. Avaliação nutricional do plasma.	47
QUADRO 13. Efeito de diferentes concentrações de plasma não dializado no volume do pão.	52
QUADRO 14. Efeito de diferentes concentrações de plasma dializado no volume do pão.	53

QUADRO 15. Avaliação da qualidade dos pães elaborados com diferentes concentrações de plasma não dializado.	56
QUADRO 16. Avaliação da qualidade dos pães elaborados com diferentes concentrações de plasma dializado.	57
QUADRO 17. Conteúdo de proteína nos pães controle e com 2,5 e 5% de plasma dializado.	58
QUADRO 18. Avaliação nutricional do pão elaborado com 0, 2,5 e 5% de plasma dializado.	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

	página
FIGURA 1. Solubilidade das proteínas do plasma não dializado. Efeito do pH.	26
FIGURA 2. Solubilidade das proteínas do plasma dializado. Efeito do pH.	27
FIGURA 3. Solubilidade das proteínas do plasma. Efeito de diferentes concentrações de cloreto de sódio.	28
FIGURA 4. Diagrama de fluxo das operações empregadas no isolamento das proteínas do plasma.	34
FIGURA 5. Determinação de peso molecular. Curva padrão.	43
FIGURA 6. Curvas de crescimento médio dos ratos alimentados com as dietas de caseína, plasma não dializado e plasma dializado.	49
FIGURA 7. Curvas de crescimento dos ratos alimentados com as dietas de pão.	60
FOTO 1. Eletroforese em poliacrilamida das proteínas do plasma	39
FOTO 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 10 M de uréia.	40
FOTO 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio.	42

- FOTO 4. Eletrofocalização em gel das proteínas do plasma 45
- FOTO 5. Efeito de diferentes concentrações de plasma dializado e não dializado no volume do pão. 51

## RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo o estudo de algumas das propriedades funcionais do plasma de frango, o valor biológico de suas proteínas e sua utilização em panificação.

Para este estudo foi utilizado como anticoagulante solução de citrato de sódio, na concentração final de 0,5%. O sangue, coletado durante a sangria dos animais, foi misturado com o anti-coagulante, obtendo-se o sangue líquido, que foi centrifugado, separando-se a massa celular do plasma. O plasma, líquido sobrenadante que representa cerca de 70% do sangue total, foi dializado e seco por liofilização. Utilizou-se ainda para comparação, outra amostra de plasma não dializado.

Na análise química encontrou-se uma maior concentração de proteína e menor concentração de cinzas no plasma dializado, quando comparado com o plasma não dializado.

Foram estudadas as características de solubilidade em meio aquoso e em diferentes faixas de pH. Encontrou-se menor solubilidade das proteínas do plasma não dializado no pH 4,5 com 53% de N solúvel, enquanto que para o plasma dializado foi no pH 5, com 21% de Nitrogênio solúvel. Um aumento da solubilidade das proteínas no pH de mínima solubilidade foi observado na presença de 0,1 ou 0,25 M de NaCl.

A determinação de albuminas e globulinas nas proteínas do plasma mostra que 56% das proteínas estão constituídas por albuminas e 44% por globulinas.

A análise de aminoácidos mostra que o único aminoácido limitante das proteínas do plasma de frango, é a isoleucina, cujo con

teúdo atinge 93% em relação ao padrão.

Também foi estudada a digestibilidade enzimática, com pepsina e pancreatina, encontrando-se 83% de digestibilidade no plasma não dializado e 92% no plasma dializado, o que representa sob este ponto de vista um produto excelente para o consumo humano.

No isolamento das proteínas do plasma verificou-se que a mais alta recuperação das proteínas (87%) é obtida quando o plasma é primeiramente alcalinizado à concentração de 0,2 N de NaOH, e depois precipitadas as proteínas no pH de mínima solubilidade. A análise de aminoácidos desta proteína isolada mostra uma grande deficiência em cistina.

Por eletroforese em gel de poliacrilamida foi possível a separação de 9 tipos diferentes de proteína. A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo uréia, revelou que pelo menos 5 unidades estruturais constituem as proteínas. Por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (dodecil sulfato de sódio), foram separadas 9 frações de proteínas, determinando-se os pesos moleculares dos polipeptídeos e encontrando-se um máximo de 115,000 e um mínimo de 24,000. Por eletrofocalização em gel foram separadas 3 frações de proteínas com pontos isoeletricos de 5,7; 5,3 e 4,8.

A avaliação nutricional dos plasmas mostram valores de PER (coeficiente de eficiência protéica) ligeiramente superiores ao da caseína, e as curvas de crescimento dos ratos alimentados com as dietas dos plasmas foram semelhantes às da caseína, comprovando-se o alto valor biológico das proteínas do plasma de frango.

Foram feitos testes de panificação adicionando plasma dializado ou não dializado em diferentes concentrações, observando-se um aumento de volume do pão quanto maior a concentração de plasma dializado, e uma diminuição do volume quando se aumentou a con-

centração de plasma não dializado.

Comparou-se os valores de PER obtidos com as dietas de pão comum (controle) e com as dietas de pão elaborado com a adição de plasma dializado. Encontrou-se para o pão controle um PER de 0,87, que se elevou para 1,67 com a adição de 2,5% de plasma, e até 2,02, com a adição de 5% de plasma em relação à farinha. As curvas de crescimento mostram uma grande diferença entre os ratos alimentados com as dietas de pão com farinha não fortificada e aquelas em que o plasma foi adicionado, levando à conclusão que houve uma complementação dos aminoácidos de ambas as proteínas.

## SUMMARY

The objectives of the present work were to study some of the functional properties of chicken blood plasma, the biological value of its proteins and its utilization in baking.

In this study a 0.5% solution of sodium citrate was used as an anticoagulant. The blood which was collected during the bleeding of the animals, was mixed with the anticoagulant, and the liquid blood was centrifuged to separate the cellular portion from the plasma. The plasma, a supernatant fraction which represents about 70% of the total blood volume, was dialyzed and freeze-dried. Another sample of plasma was left undialyzed for comparison.

Proximate analysis showed that the dialyzed plasma contained a higher concentration of protein and a smaller concentration of ash in comparison to plasma which was not dialyzed.

The solubility characteristics in aqueous medium were studied in different pH ranges. It was found that the minimum protein solubility of the non-dialyzed plasma occurred at pH 4.5 with 53% of the N being soluble. On the other hand for the dialyzed plasma the lowest solubility occurred at pH 5.0 with 21% of the N being soluble. An increase in solubility of the proteins at the pH of minimum solubility was observed in the presence of 1.0 or 0.25 N of NaCl.

The albumins were found to make up 56% and the globulins 44% of the total proteins of the plasma.

Amino acid analysis showed that the only limiting amino acid of

the proteins of chicken blood plasma was Isoleucine, being 93% of the FAO standard.

Digestibility of the freeze-dried plasma was studied using pepsin and pancreatine. The digestibility of the non-dialyzed plasma was found to be 83% and for the dialyzed sample 92%. This showed that plasma was an excellent product for human consumption.

Upon isolating the proteins of plasma it was shown that the highest recovery of proteins (87%) was obtained when the plasma was first alkali-treated with 0.2 N of NaOH. Subsequently the proteins were precipitated with HCl at the pH of minimum solubility. Amino acid analysis of this protein isolate showed a great deficiency in cystine.

Polyacrylamide-gel electrophoresis gave a pattern with nine different types of proteins. Urea-gel electrophoresis showed five protein bands while SDS gel electrophoresis (sodium dodecyl sulfate) gave nine protein bands with a maximum molecular weight of 115,000 and a minimum of 24,000. With gel electrofocusing 3 fractions with isoelectric points of 5.7, 5.3 and 4.8 were separated.

Nutritional evaluation of plasma using the PER (protein efficiency ratio) method showed slightly higher PER values than casein. The growth curves of rats fed on plasma were similar to those of casein-fed rats indicating the high biological value of proteins from chicken blood plasma.

Baking tests were conducted by introducing either the dialyzed or the non-dialyzed plasma in the bread at three different levels. Increase in loaf volume was observed with increasing concentration of dialyzed plasma, while a decrease of loaf volume was observed with increasing concentration of non-dialyzed

plasma.

The PER values obtained with the common bread (control bread) and the bread in which plasma had been added were compared. For the control bread a PER of 0.87 was observed. This was raised to 1.67 upon fortification with plasma at the 2.5% level, and to 2.02 with fortification at the 5% level. The growth curves showed a great difference between rats fed a diet consisting of bread not fortified and those fed a diet consisting of plasma added to the bread. The amino acids of both protein sources, that of the wheat flour and of the blood plasma appeared to complement one another.

## 1. INTRODUÇÃO

O sangue, um subproduto dos abatedouros se caracteriza por posuir proteínas de alto valor biológico e, quando desperdiçado, ocasiona serios problemas de poluição.

Na atualidade, em que se discute muito a escassez de alimentos e principalmente a de origem animal somos levados a pensar no aproveitamento dessa considerável fonte de proteína.

Nos últimos 10 anos, nos países desenvolvidos, diferentes autores tem estudado as propriedades funcionais e nutritivas do plasma bovino (31) (37) e porcino (12) (13), com a finalidade de introduzi-lo na alimentação humana, pelo fato de terem verificado que as proteínas desses plasmas, possuem um alto valor nutritivo. No entanto, na literatura consultada, nacional ou estrangeira, não foram encontrados estudos específicos para o aproveitamento do sangue de aves, como alimento humano.

Tendo em vista o acelerado crescimento da avicultura e a instalação de novos abatedouros, providos dos mais modernos e higiênicos equipamentos, especialmente no Brasil e no México que ocupam o 2º e 3º lugares em produção avícola na América, e tendo em conta ainda, que cada frango fornece em média 55 ml de sangue, é necessário considerar este subproduto dos abatedouros como uma fonte potencial de proteínas de alta qualidade, para consumo humano. Em 1974, a produção do Brasil foi de 259,5 milhões de cabeças e a do México foi de 160 milhões (16), cifras que deverão aumentar consideravelmente nos próximos anos.

Em alguns abatedouros de aves, o sangue é processado na mesma indústria, transformando-o em farinha para o consumo animal ,

prática que já representa um certo grau de aproveitamento. Todavia, esta utilização, mesmo parcial, nem sempre é praticada, e nestes casos joga-se com as águas residuais, constituindo-se em fonte poluidora de graves consequências.

O presente trabalho tem como objetivo a recuperação e aproveitamento do plasma de sangue de frango, estudando-se algumas de suas propriedades funcionais, valor biológico de suas proteínas e emprego do plasma seco em panificação, visando sua utilização na alimentação humana.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Generalidades sobre o sangue.

O sangue, na forma em que se apresenta no sistema vascular consiste de massa celular (eritrócitos, leucócitos, plaquetas) e uma porção líquida chamada plasma que contém um grande número de substâncias orgânicas e inorgânicas em solução.

A fluidez que apresenta o sangue in vivo só poderá ser mantida in vitro evitando-se o fenômeno de coagulação, considerado como um mecanismo protetor contra perdas anormais de sangue com a ruptura de vasos sanguíneos.

A coagulação é essencialmente um fenômeno do plasma, na qual participam entretanto, as plaquetas. A massa celular é retida na rede do coágulo gelatinoso de fibrina, que se contrai com o repouso, expulsando um líquido de cor amarelada chamado soro. A diferença entre o plasma e o soro reside na presença de fibrinogênio no plasma; o soro é desprovido dessa proteína, devido à formação de fibrina no processo de coagulação. Os anticoagulantes mais usados (oxalatos, citratos) atuam eliminando ions de  $Ca^{++}$  do plasma, os quais são indispensáveis na ativação da protrombina, sendo este o primeiro estágio de coagulação.

As importantes funções de transporte do sangue, são realizadas pelo plasma, exceto oxigênio que é transportado quase que exclusivamente pela Hemoglobina (eritrócitos) e o  $CO_2$  que é transportado pelo plasma e pelos eritrócitos.

A composição química do sangue é muito complexa e sofre variações com a espécie, idade, sexo, alimentação e outros fatores. (9).

As proteínas constituem as substâncias específicas, características do plasma. Pertencem a dois tipos principais: albuminas e globulinas. Outras sub frações tem sido encontradas pela precipitação fracionada e por eletroforese. (21)

## 2.2. O sangue como alimento humano.

No presente, existe um aumento na escassez mundial de proteína animal adequada para consumo humano. Entretanto, quantidades consideráveis de sangue animal são desperdiçadas anualmente devido à indiferença por parte da indústria de alimentos. Os maiores usos industriais de sangue animal, até agora, são na manufatura de salsichas, hamburguer e carnes preparadas; rações animais e como componente das formulações de fertilizantes. Contudo, porque o sangue animal representa uma boa fonte de proteínas de alto valor biológico existe considerável interesse no fracionamento do sangue e no isolamento e preparo de concentrados protéicos para consumo humano. Em 1972 foi iniciado um projeto pelo "Moorepark Research Centre" com o objetivo fundamental de introduzir na alimentação humana produtos protéicos a partir do sangue animal. (13)

VECHLABSKI e col. (33) em seus trabalhos sobre preservação do sangue estudou a possibilidade do uso de ureia 1%, amonia 0,5% ou metabisulfito de sódio 1% como estabilizantes. Desses, o metabisulfito de sódio 1% foi o mais efetivo, dando estabilização de 28 dias a 29°C, 21 dias a 20°C e 10 dias a 30°C, sem que ocorressem mudanças organolépticas ou microbiológicas. Usando amonia como preservativo e polifosfatos como anticoagulante encontrou-se que o tempo de armazenagem máximo, sem refrigeração, foi de 36 horas. O preservativo foi eliminado durante a secagem do plasma ou da massa celular. A aplicação destes preservativos foi estudada somente para o sangue que se destina à alimentação animal.

AKERS (2) estudou métodos de recuperação e manuseio do sangue

animal e descreveu a utilização de uma faca ôca para a sangria e coleta do sangue. A faca é introduzida no animal e sob a ação do vácuo o sangue flui rapidamente, misturando-se com o anticoagulante que vai incorporando-se pela base da faca.

De acordo com o autor este procedimento é o mais higiênico para a obtenção de sangue destinado ao consumo humano, já que o contato do sangue com a carcaça é eliminado.

DAVIS e col. (11) calcularam a recuperação de subprodutos de aves com base em dados de 1955. De acordo com os seus cálculos, 90% das vísceras, 75% das penas e 44% do sangue são recuperados por granjeiros, negociantes e outros. Ele indica que frente ao aumento de processamento de aves, a recuperação e utilização dos sub produtos deverá aumentar.

DELANEY e col. (13) tem reportado sobre o uso de ultrafiltração para a concentração e purificação de plasma porcino, e transformação do plasma concentrado em pó por secador tipo "spray".

TAYBOR e col. (31) concentraram por "spray drying" as frações correspondentes às proteínas do plasma e globina do sangue bovino. Ambas as frações apresentaram ótimas características de emulsificação, apresentando uma resposta linear com respeito à concentração de proteína presente no sistema. Também observaram que a capacidade do plasma concentrado para formar espuma é equivalente à da albumina do ovo, em condições ótimas de concentração de proteína e de pH.

SATERLEE e col. (28) mediram as propriedades emulsificantes de diferentes proteínas em forma de pó e obtiveram os mais altos resultados para o sangue animal. Reportaram seus resultados em mililitros de óleo por 100 miligramas de proteína, sendo encontrado para o sangue 43,82; leite desengordurado 12,0; músculo de vaca 23,5; e colágeno hidrolizado 12,1. De acordo com BREYER e

GOODWIN ( 8 ) essa grande capacidade emulsificante do sangue justifica sua utilização nas formulações de produtos alimentícios.

Segundo HUANG (23) o sangue de porco, cozido, bem como, o de frango e pato têm sido usado por longo tempo como alimento huma-no. Huang estudou a suplementação de dietas de arroz ou trigo com proteínas de plasma de porco e reportou um grande aumento no valor nutritivo das proteínas dos cereais como resultado dessa suplementação.

DELANEY (12) encontrou também que as proteínas de plasma porci-no preparadas por ultrafiltração e "spray drying" possuem um alto valor nutritivo. Obteve nos seus estudos biológicos um va-lor NPU de 65,8 para as proteínas do plasma e de 72,0 para a caseína. A comparação dos aminoácidos essenciais do plasma concen-trado com os de ovo revelou a isoleucina como aminoácido limi-tante. Os conteúdos de aminoácidos sulfurados são equivalentes-aos encontrados na caseína, os quais são considerados nutricio-nalmente adequados; foram encontrados conteúdos adequados ou em excesso de treonina, leucina, tirosina e lisina. Destes resulta-dos pode-se concluir que as proteínas do plasma porcino podem complementar as proteínas de milho, soja e outras proteínas ve-getais na dieta.

YOUNG e col. (37) mostraram que o plasma bovino desalinizado e sêco apresentou um valor PER de 2,83, sendo 2,5 para caseína; na mesma base, as proteínas da fração globina apresentaram um va-lor PER de -1,05. A adição de 1,2% de DL-isoleucina à dieta cau-sou uma elevação do PER para 2,88. O PER negativo para a globi-na foi devido à grande deficiência de isoleucina nessa fração - que possui apenas 0,34g/100 g de proteína. Entretanto, essa fra-ção é rica em histidina, que é um aminoácido essencial para crianças.

Um método para fiação das proteínas de plasma bovino foi descri

to por YOUNG e LAWRIE (38). Eles verificaram que as proteínas do plasma, concentradas por liofilização parcial e desnaturadas com álcali exibem propriedades adequadas para fiação. As fibras, obtidas por precipitação ácida e/ou salina, segundo eles, podem ser aceitas como um análogo da carne e apresentam um alto valor nutritivo.

KOBERT (25) em 1915, menciona a utilização do sangue animal em pão, promovida pela escassez de alimentos durante a Primeira - Guerra Mundial, nesse estudo é recomendada a adição de 10% de sangue animal em todas as refeições.

JACOB (24) em 1954, faz referência à fortificação do pão com sangue porcino durante a Idade Média, especialmente no Norte da Suécia.

BATES e MURPHY (5) estudaram o uso de sangue porcino e soro de queijo em panificação. Nas formulações dos pães adicionaram soro de queijo e/ou sangue, em substituição à água. As propriedades de panificação dessas misturas foram similares às do pão tomado como controle, feito sem a adição de sangue ou soro. O volume específico e a textura do miolo foram inferiores às do controle. Nos estudos biológicos obtiveram os seguintes valores de PER, para as diferentes formulações de pão: pão controle, 0,83; soro 1:1, 1,82; sangue: soro 1:3, 1,38 e para a caseína 2,5.

Os autores compararam os valores de PER alcançados com sangue: soro 1:1 e 3:1 com o pão fortificado com 12% de farinha de soja, e encontraram que os valores são similares.

GORDON (19) propõe a substituição do gelo usado na fabricação de hamburgo, salsicha, chouriço, etc., por plasma animal, em forma de flocos de gelo, aumentando assim, o nível de proteína e as propriedades de adesividade do produto cozido. Propõe também, a utilização da massa celular como pigmento adicional em carnes - curadas.

DILL (14) verificou que adicionando somente 1% de sôro de sangue bovino, sêco por atomização, nas formulações de salsichas e hamburgos, o efeito de adesividade dos produtos aumentava, e su gere o estudo desse efeito com quantidades menores de sôro ou plasma.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material.

##### 3.1.1. Amostra Utilizada.

Sangue de frango, raça Peterson, obtido no matadouro - (Frango Soberbo, Louveira, São Paulo), durante a sangria dos animais, efetuada mediante um corte na veia jugular interna.

##### 3.1.2. Reagentes.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico das marcas: Reagen, Carlo Erba, Merck, Baker, Sigma e Eastman.

##### 3.1.3. Equipamentos.

Centrífuga refrigerada "Sorvall Superspeed Model RC2-B".

Liofilizador "Virtis Model nº 10-146 MR-BA".

Potenciômetro "Corning Digital 110".

Potenciômetro "H-5 Horiba".

Agitador rotativo "V-Gyrotory Shaker Mod. V-37295".

Agitador rotativo com temperatura controlada "Gyrotory Shaker Mod. G-25.

Espectrofotômetro "U.V. Spectrophotometer Perkin Elmer 402".

Analizador de aminoácidos "Beckman Model 120C".

Conjunto para eletroforese em gel.

Moinho de martelos tipo CV2.

Evaporador rotativo "Thermo-Lift".

Extrator Goldfish "Labconco Corporation Mod. 35001".

Tunel de secagem (projeto e construção na FEA).

Farinógrafo Resistógrafo "Brabender".

Extensógrafo "Brabender".

Equipamento para panificação "Siam-Util".

Gaiolas de tela e chapa galvanizadas para ratos.

Equipamento e material de vidro de uso comum no laboratório.

#### 3.1.4. Animais usados na avaliação nutricional.

Ratos brancos da raça "Wistar" com idade de 21-25 dias, machos e fêmeas, provenientes do Instituto Biológico da Secretaria da Agricultura de São Paulo.

#### 3.1.5. Ingredientes usados na dieta para determinação de PER.

Foram utilizados produtos comerciais e farmacêuticos, exceto os sais minerais que eram quimicamente puros, a saber: caseína comercial; amido de milho, grau alimentício; óleo de soja (Primor); sacarose (açúcar União); vitaminas, grau farmacêutico; sais minerais, de diversas procedências.

#### 3.1.6. Ingredientes para a elaboração do pão.

Utilizaram-se produtos comerciais, a saber: farinha de trigo nacional, 72% de extração; gordura vegetal hidrogenada - (Saúde); sal iodado (Mot); fermento (Itaiquara); sacarose (açúcar União); ácido ascórbico.

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Preparação da amostra.

Imediatamente após o corte da veia jugular dos animais, o sangue foi colocado em recipientes de plástico e misturado com uma solução aquosa de citrato de sódio 5% (p/v) (100 ml / litro de sangue) a qual atuou como anticoagulante, obtendo-se o sangue líquido. A solução é adicionada à medida que o sangue é colocado no recipiente.

Foram testadas soluções de citrato de sódio em diferentes concentrações (2, 5, 7, 8, 10%), sendo que com a solução a 5% não se encontrou hemólise e o efeito anticoagulante foi completo.

A mistura sangue-anticoagulante foi transportada ao laboratório em recipientes de plástico de 15 litros, mantidos em gelo.

Imediatamente foi submetida a centrifugação nas condições seguintes:

Fôrça centrífuga: 4000 x g  
Tempo: 15 minutos  
Temperatura: 10°C

Nestas condições, o sangue foi fracionado em seus componentes massa celular e plasma. A massa celular, viscosa, de cor vermelha e o plasma, líquido sobrenadante, de cor âmbar amarelo-claro e translúcido.

O plasma foi dializado em sacos de celofane contra água deionizada durante 48 horas à temperatura da geladeira (5°C). O material dializado foi seco por liofilização, obtendo-se um pó de cor amarelo claro e brilhante, que foi chamado plasma dializado.

Uma outra amostra de plasma não foi dializada. Foi também seca por liofilização, obtendo-se um pó semelhante ao de plasma dializado. A amostra assim tratada foi chamada plasma não dializado.

### 3.2.2. Análises químicas.

Nos plasmas dializado e não dializado foram feitas análises de umidade, proteína, nitrogênio não proteico (NNP), óleo e cinzas.

Todas as análises foram feitas com quatro repetições, cujos valores médios estão apresentados nos resultados.

a) Umidade : Foi determinada segundo o método descrito no AOAC (4). As amostras foram pesadas em cápsulas de porcelana, levadas à estufa e mantidas a 110°C até obtenção de peso constante. A porcentagem de umidade foi calculada por diferença entre

o peso inicial e final.

- b) Nitrogênio total: Determinado pelo método Kjeldahl descrito no AOAC ( 4 ), cujo teor multiplicado pelo fator 6,25 representa a porcentagem de proteína bruta.
- c) Nitrogênio não protéico: Determinado pelo método de Moog's ( 4 ) segundo o qual as proteínas do plasma são precipitadas com ácido tricloracético na concentração final de 10%, e o nitrogênio em seguida é determinado no sobrenadante.
- d) Óleo: Determinou-se segundo o método descrito no AOAC ( 4 ) utilizando o aparelho de extração contínua de Goldfish. A extração foi feita com éter de petróleo sob refluxo contínuo através da amostra, durante 6 horas.
- e) Cinzas: A determinação foi feita segundo o método descrito em AOAC ( 4 ). Após pesagem, as amostras foram carbonizadas em cápsulas de porcelana e levadas a mufla a temperatura de 550°C durante 6 horas. As cápsulas com o material incinerado foram pesadas e por diferença com o peso inicial calculou-se a porcentagem de cinzas.

### 3.2.3. Estudo da solubilidade das proteínas do plasma liofilizado.

3.2.3.1. Efeito do pH: O solvente utilizado foi água destilada e a relação plasma: solvente de 1:40 (p:v). O pH foi ajustado a 2; 3; 4; 4,5; 5; 6; 7; 8; 9; 10 e 11 pela adição de NaOH 1N ou HCl 1N. As suspensões foram agitadas durante 2 horas à temperatura ambiente, reajustando-se o pH depois de uma hora de agitação lenta. Em seguida centrifugou-se a 16.000 x g durante 15 minutos, eliminando-se todo material não solúvel por filtração do sobrenadante através de lã de vidro. O Nitrogênio foi determinado no sobrenadante, e o cálculo do

nitrogênio solúvel foi feito com base no nitrogênio total da amostra.

3.2.3.2. Efeito de diferentes concentrações de cloreto de sódio: A amostra foi suspensa em soluções de cloreto de sódio em concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 M, e a relação sólido-solvente foi de 1:40 (p:v). O pH foi ajustado a 5 (mínima solubilidade em água) para o plasma dializado, e a 4,5 (mínima solubilidade em água) para o plasma não dializado. As demais operações foram idênticas às descritas para o estudo do efeito do pH.

3.2.4. Conteúdo de proteínas tipo albuminas e globulinas no plasma.

A amostra foi suspensa em uma solução de cloreto de sódio 2% em relação 1:20 (p:v). Agitou-se durante 1 hora à temperatura ambiente e em seguida centrifugou-se a 16.000 x g durante 15 minutos. O conteúdo de proteína no líquido sobrenadante foi determinado pelo método de Biureto. Outra parte do líquido sobrenadante foi dializada em sacos de celofane durante 24 horas contra água deionizada à temperatura da geladeira (5°C). O material dializado foi centrifugado a 16.000 x g durante 15 minutos. O conteúdo de albuminas foi determinado no sobrenadante e por diferença obteve-se o conteúdo de globulinas.

3.2.5. Determinação de aminoácidos.

Na determinação do conteúdo de aminoácidos usou-se o método de hidrólise ácida das proteínas descrito no Manual Beckman (6) e a análise dos aminoácidos foi feita pelo método de colunas de troca iônica de Spackman e col. (29) com o analisador Beckman Modelo 120 C.

A hidrólise foi feita em uma ampola especial de vidro, na qual foi pesada a amostra contendo 25mg de proteína adicionando-se a seguir 15 ml de HCl 6 N. A ampola foi fechada com

chama sob vácuo e em seguida colocada em estufa a 110°C durante 22 horas. Ao fim deste tempo quebrou-se o topo da ampola e o hidrolizado foi filtrado através de filtro de placa porosa. O volume foi completado a 50 ml com água deionizada e uma alíquota de 20 ml foi utilizada para a completa eliminação do HCl através da evaporação completa da solução ácida e mais duas evaporações sucessivas após redissolução do resíduo em água deionizada. O resíduo final foi redissolvido em 10ml de tampão citrato de sódio pH 2,2. Usou-se 0,4 ml desta solução para se colocar nas colunas do analisador.

O triptofânio, que é destruído pela hidrólise ácida, foi determinado pelo método colorimétrico descrito por Spies (30).

### 3.2.6. Determinação da digestibilidade "in vitro".

Usou-se o método descrito por Akeson e Stahamann (3) e modificado por Villegas et al. (32).

Pesou-se a amostra em uma quantidade equivalente a 500mg de proteína, à qual se adicionou pepsina em HCl 0,1N, em uma relação enzima: substrato 1:20. Ajustou-se o pH a 1,6 com HCl 0,1N e incubou-se com agitação contínua durante 4 horas a 37°C, depois, o pH da suspensão foi elevado a 8 com NaOH 0,5 N adicionando-se em seguida pancreatina em tampão fosfato pH 8 em uma relação enzima substrato 1:125. Adicionou-se ainda 0,1 ml de solução alcoólica de mertiolate 1:1000, para evitar a contaminação com microrganismos.

A suspensão foi incubada a 37°C com agitação constante durante 22 horas. A enzima foi inativada por aquecimento em Banho-maria a 100°C durante 2 minutos. As proteínas não digeridas foram precipitadas com TCA na concentração final de 12%. A mistura foi centrifugada por 30 minutos a 1500 x g. No sobrenadante determinou-se o conteúdo de nitrogênio, e a porcentagem de digestibilidade foi calculada pela fórmula seguinte:

$$\% \text{ de digestibilidade} = \frac{\% \text{ N digerido}}{\% \text{ N na amostra}} \times 100$$

### 3.2.7. Isolamento das proteínas do plasma.

Utilizou-se o plasma líquido, obtido depois da separação da massa celular. Em duas amostras, adicionou-se NaOH em cristais, até obter em uma delas uma concentração de 0,2 N (pH 13) e na outra pH 9. Agitou-se durante 2 horas à temperatura ambiente, em seguida centrifugou-se durante 30 minutos a 16.000 x g. O resíduo foi descartado e o sobrenadante ajustado ao pH de mínima solubilidade (pH 4,5) com HCl 2 N, precipitando-se as proteínas e deixando-se em repouso durante 4 horas. A proteína precipitada foi separada por centrifugação durante 30 minutos a 10.000 x g. A proteína isolada foi congelada e liofilizada.

Ainda, outra amostra do plasma foi ajustada diretamente no pH de mínima solubilidade (pH 4,5) com HCl 2 N, precipitando-se as proteínas e deixando-se 4 horas em repouso. A proteína precipitada foi separada por centrifugação durante 30 minutos a 10.000 x g e seca por liofilização.

Utilizou-se em cada experimento 1 litro do plasma e calculou-se o rendimento obtido em proteína isolada para cada um dos métodos descritos.

### 3.2.8. Eletroforese das proteínas em gel de poliacrilamida.

O plasma dializado foi dissolvido em tampão Tris-glicina pH 8,2 - 8,4, para uma concentração de 2,5 mg de proteína/ml. Colocou-se 0,2 ml desta solução em cada tubo de gel de poliacrilamida. Para a eletroforese e a preparação dos géis foi utilizado o procedimento descrito em "Annals of the New York Academy of Science" (1) para "disk electroforesis" em gel de poliacrilamida 8%.

### 3.2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamina contendo uréia.

Seguiu-se o método recomendado por Wray e Stubblefield (35). O procedimento é similar ao da eletroforese em gel simples, exceto com relação às soluções usadas que são diferentes.

### 3.2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS).

Seguiu-se o método de Weber e Osborn (34) de determinação de pesos moleculares das subunidades da proteína.

Para a estimação do peso molecular foi calculada a mobilidade pela seguinte fórmula:

$$MR = \frac{\text{migração da banda após descoloração}}{\text{migração do corante após corrida}} \times \frac{\text{comprimento do gel antes da coloração}}{\text{comprimento do gel após a descoloração}}$$

Foi feita uma curva padrão, onde foram graficadas em escala semi-logarítmica, às mobilidades contra os pesos moleculares conhecidos das proteínas padrões. Com as mobilidades das amostras calcularam-se os pesos moleculares na curva padrão, feita nas mesmas condições que as amostras.

### 3.2.11. Eletrofocalização em gel.

Utilizou-se o método descrito por Wrigley (36) para "isoelectric focusing" em gradientes de pH, para a separação das proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico. A eletrofocalização foi conduzida na faixa de pH 3-10.

### 3.2.12. Avaliação nutricional de plasma dializado e não dializado.

O valor biológico das proteínas foi determinado pelo método de PER (quociente de eficiência proteica), utilizando-se testes de crescimento com ratos. A caseína foi usada como padrão em

todos os casos. Durante os experimentos os animais foram mantidos em gaiolas individuais com água e ração "ad libitum".

Para os testes foram usados grupos de cinco ratos do sexo feminino, tipo "Wistar" com idade de 21 a 25 dias.

As primeiras 48 horas foram consideradas como um período de adaptação à ração. Após este período foram iniciadas as pesagens dos ratos e das dietas consumidas, em períodos regulares durante 28 dias. Calculou-se no final do experimento o valor de PER que é o quociente de ganho de peso (g) pela proteína consumida (g). Os valores encontrados foram corrigidos para ca seína igual a 2,5.

### 3.2.13. Preparo das dietas.

A composição das dietas utilizadas para a determinação dos valores de PER, está especificada no Quadro 1 .

QUADRO 1 . Composição das dietas utilizadas para a determinação do PER.

Componentes	Porcentagem
Proteína (proveniente da amostra)	10
Carbohidratos:	
Amido de milho	50
Sacarose	25
Óleo de soja comercial	8
Mistura salina (Ver Quadro 2 )	5
Mistura vitamínica (Ver Quadro 3 )	2

QUADRO 2 . Composição da mistura salina usada nas dietas.

Componentes	Porcentagem
Molibdato de Amônio. 4 H <sub>2</sub> O	0,003
Carbonato de Cálcio	29,290
Fosfato de Cálcio. 2 H <sub>2</sub> O	0,430
Sulfato Cúprico	0,156
Citrato Fêrrico. 6 H <sub>2</sub> O	0,623
Sulfato de Magnésio. 7 H <sub>2</sub> O	9,980
Sulfato de Manganês. H <sub>2</sub> O	0,121
Iodeto de Potássio	0,0005
Fosfato de Potássio	34,310
Cloreto de Sódio	25,060
Selenito de Sódio. 5 H <sub>2</sub> O	0,002
Cloreto de Zinco	0,020

- A composição da mistura salina usada foi a de Rogers e Harper (26).

QUADRO 3 . Composição da mistura vitamínica.

Componentes	g para 1000g da mistura
Vitamina E	5,0
Vitamina K	1,5
Vitamina B6	0,5
Vitamina B12	0,00166
Vitamina A (500.000 UI/g)	1,8
Vitamina D (40.000 UI/g)	0,25
Inositol	2,0
Niacina	2,0
Riboflavina	0,5
Tiamina HCl	0,5
Biotina	0,020
Ácido Fólico	0,10
Pantotenato de Cálcio	2,0
Ácido p-amonobenzóico	2,0
Cloreto de Colina	75,0
Ácido Ascórbico	45,0
Etoxiqum	20,0
Açúcar trirefinado e farinha de mandioca em partes iguais para - completar 1000 g da mistura	

3.2.14. Efeito de diferentes concentrações do plasma dializado e não dializado na elaboração de pão.

Foi elaborado pão de fôrma adicionando plasma dializado ou não dializado em diferentes concentrações. Para o teste de panificação foi utilizado o método desenvolvido por El Dash - (15) no Laboratório de Panificação da UNICAMP. Usou-se o fari nógrafo Brabender como misturador dos ingredientes, a câmara a 30°C do extensôgrafo Brabender como câmara de fermentação e o forno de cozinha para assar a massa.

No Quadro 4 está apresentada a formulação utilizada para a elaboração do pão.

QUADRO 4 . Formulação da massa para panificação.

Componentes	%	g
Farinha de trigo	100	300 ( em base 14% umi dade)
Fermento	3	9
Açúcar	5	15
Gordura	3	9
Sal iodado	2	6
Ácido ascórbico	0,009	0,027

O plasma dializado ou não, foi adicionado na formulação em con

centrações de 2,5; 5,0 e 7,5% em relação à farinha. O padrão foi o pão de trigo elaborado sem adição de plasma.

#### 3.2.14.1. Teste de panificação.

Colocou-se a mistura de farinha e plasma no farinógrafo, adicionou-se misturando continuamente os outros ingredientes em solução, na seguinte ordem: fermento, sal e açúcar, vitamina C e finalmente a gordura. Agregou-se mais água até completar o volume pré-determinado para se obter 500 U.F. A massa foi misturada até que a consistência apresentasse uma redução de 10 U.F. da linha original de 500 U.F. Este ponto foi considerado como o tempo ótimo de mistura.

A massa foi cortada em duas porções de 150g cada uma e arredondou-se no boleador do extensógrafo, colocando-se em seguida em fôrmas especiais com as seguintes medidas: inferior 13x5,5 cm; base superior 14x7 cm; altura 4cm, e levando-se à câmara do extensógrafo por 2 horas a 30°C com umidade.

Após a fermentação tirou-se da câmara e levou-se ao forno a 210°C por 20 minutos. Após esfriamento (2 horas) os pães foram pesados e medido os seus volumes.

#### 3.2.14.2. Avaliação da qualidade do pão.

Os testes da avaliação da qualidade dos pães elaborados com as diferentes concentrações de plasma dializado e não-dializado foram efetuados pelo Laboratório de Panificação da Faculdade de Engenharia de Alimentos.

#### 3.2.15. Avaliação nutricional do pão elaborado com diferentes concentrações de plasma.

Seguiu-se o mesmo método descrito em 3.2.12. utilizando-se 3 ratos do sexo feminino e 3 ratos do sexo masculino em cada grupo.

3.2.16. Preparação do pão para incorporação às dietas.

Foi feito pão adicionando plasma dializado em concentrações de 0; 2,5 e 5% em relação à farinha, os outros ingredientes foram adicionados na mesma proporção indicada no Quadro - Para a mistura dos ingredientes utilizou-se o método Chorleywood usando-se o equipamento para panificação Siam-Util.

O pão foi seco em túnel de secagem a 39°C e moído em moinho de martelos, obtendo-se o pão em pó.

3.2.17. Preparo das dietas de pão para os ensaios biológicos.

A composição das dietas foi a mesma especificada no Quadro 1 . As quantidades de carboidratos e gordura foram adicionadas só para completar as já contidas no mesmo pão.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1. Obtenção da amostra.

Na literatura consultada são mencionados diversos compostos que atuam como anticoagulantes, sendo mais frequentemente utilizados pelos autores (13) (20), o oxalato e citrato de sódio, na concentração final de 1%, para sangue porcino e bovino. Utilizando esta mesma concentração no sangue de frango, produziu-se uma hemólise excessiva tornando-se o plasma vermelho. Em virtude disto, foram realizadas experiências preliminares - para a determinação da concentração mais adequada.

Estes ensaios mostraram que oxalato e citrato de sódio, em cristais ou em soluções, nas concentrações finais de 0,8 e 0,7% no sangue, também produzem hemólise, em concentrações finais de 0,3 e 0,4% o efeito anticoagulante não foi efetivo, tendo lugar a formação de coágulos. Com oxalato de sódio na concentração final de 0,5% não houve formação de coágulos, no entanto - produziu alguma hemólise; utilizando cristais de citrato de sódio na mesma concentração obteve-se o mesmo resultado, porém, com este sal em solução aquosa não se verificou hemólise e tão pouco coagulação. Em todos os casos a hemólise foi maior na presença do anticoagulante em forma de cristais. Obviamente, o anticoagulante selecionado foi citrato de sódio em solução aquosa, na concentração final de 0,5% no sangue, utilizando-se a relação de 100 ml de uma solução de citrato de sódio à 5% para um litro de sangue.

A hemólise produzida pelo emprego de cristais pode ser explicada pelo fato de que a mistura sangue-anticoagulante precisa de uma agitação constante para a dissolução completa dos sais, produzindo-se uma fricção dos eritrócitos com as paredes dos

recipientes e com os mesmos cristais, ocorrendo desta forma a ruptura da membrana dos eritrócitos.

As concentrações de anticoagulante utilizadas pelos autores para sangue bovino e porcino diferem da encontrada adequada para o sangue de frango, devido provavelmente a que a concentração de íons  $Ca^{++}$  no plasma, é diferente.

Depois da centrifugação do sangue, nas condições especificadas em 3.2.1., obteve-se um rendimento de 70% de plasma, em relação ao sangue total.

#### 4.2. Análises Químicas.

No Quadro 5 estão apresentados os valores médios correspondentes à composição química dos plasmas dializado e não dializado, liofilizados, efetuados segundo os métodos descritos em 3.2.1.

QUADRO 5 Composição química do plasma liofilizado

Amostras	Porcentagem				
	Umidade	Proteína (N x 6,25)	NNP	Óleo	Cinzas
Plasma não dializado					
Base úmida	5,5	56,1	1,10	0,27	19,0
Base seca	-	59,4	1,16	0,29	20,1
Plasma dializado					
Base úmida	6,7	74,3	0,70	0,19	4,3
Base seca	-	79,6	0,75	0,20	4,6

Observa-se no Quadro que no plasma dializado o conteúdo de proteína é maior, e os conteúdos de nitrogênio não proteico,

Óleo e cinzas são menores comparados com os valores de plasma não dializado.

Esta variação é devida ao fato de que na diálise, grande parte dos sais e compostos nitrogenados, não proteicos de baixo peso molecular, são eliminados, obtendo-se por isto um aumento na concentração de proteína na amostra.

#### 4.3. Estudo da solubilidade das proteínas do plasma liofilizado.

##### 4.3.1. Efeito do pH.

Ao estudar a solubilidade das proteínas do plasma dializado e não dializado, em solução aquosa a diferentes pH's, obtiveram-se as curvas indicadas nas Figuras 1 e 2 ; encontrou-se que o ponto de mínima solubilidade para o plasma não dializado está no pH 4,5, e para o plasma dializado no pH 5. Também encontrou-se que a solubilidade das proteínas de ambos os plasmas, eleva-se ao se aumentar a acidez ou a alcalinidade. O máximo valor de solubilidade (100%) observado no plasma não dializado, ocorre no pH 2, sendo que para o plasma dializado este ponto (100% N solúvel) ocorre nos pH's 10 e 11. Portanto, deste ponto de vista, as proteínas do plasma, tanto dializado como não dializado exibem solubilidades entre 90 e 100%, nos pH's 2, 3, 8, 9, 10 e 11.

##### 4.3.2. Efeito de diferentes concentrações de cloreto de sódio.

Observa-se na Figura 3 que a solubilidade das proteínas do plasma não dializado no pH 4,5, é de apenas 53%, e quando extraídas em 0,1 M de NaCl, a solubilidade eleva-se para 87%. A solubilidade das proteínas do plasma dializado no pH 5, aumentam de 21% em água para 92%, quando extraídas em 0,25M de NaCl. Portanto, o NaCl nas concentrações empregadas, aumenta consideravelmente o grau de extração das proteínas, no pH de mínima solubilidade em água, encontrando-se máxima solubilidade entre 0,1 e 0,25 M de NaCl. A solubilidade decresce à medida que se aumenta a concentração de sal, sendo este efeito mais notado no plasma não dializado.

Figura 1 . Solubilidade das Proteínas de Plasma não Dializado

Efeito do pH

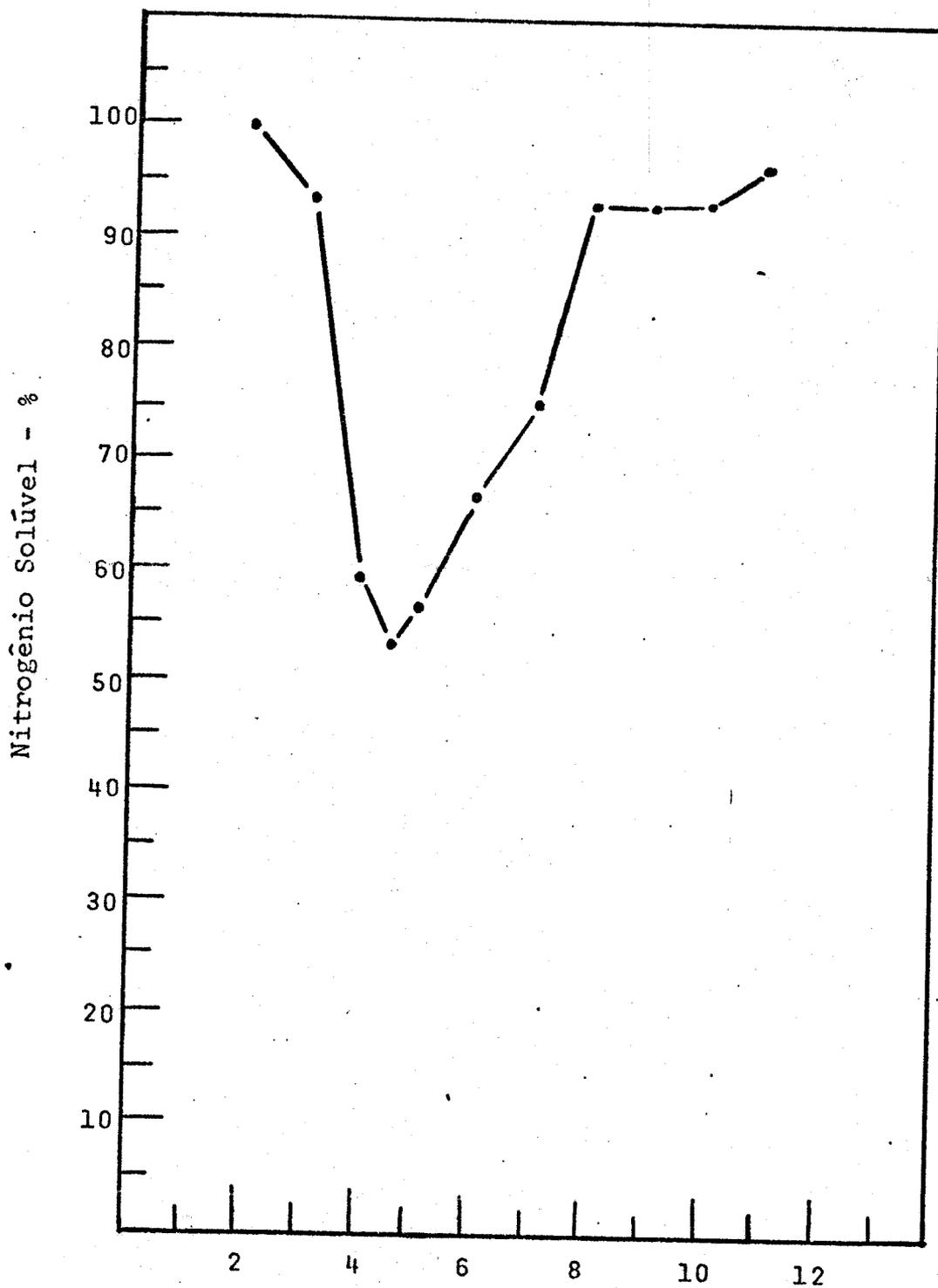


Figura 2 . Solubilidade das Proteínas de Plasma  
Dializado  
Efeito do pH.

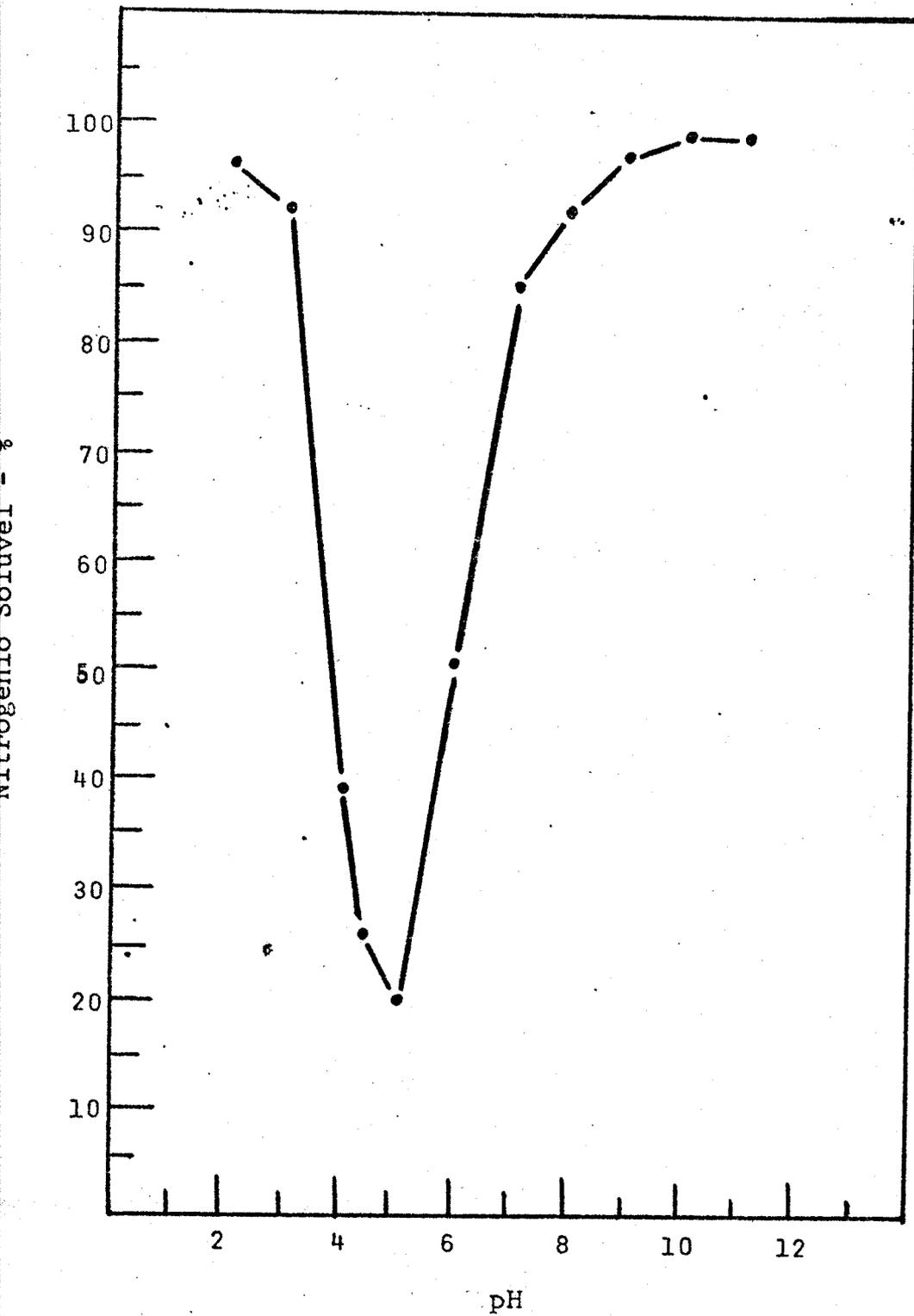
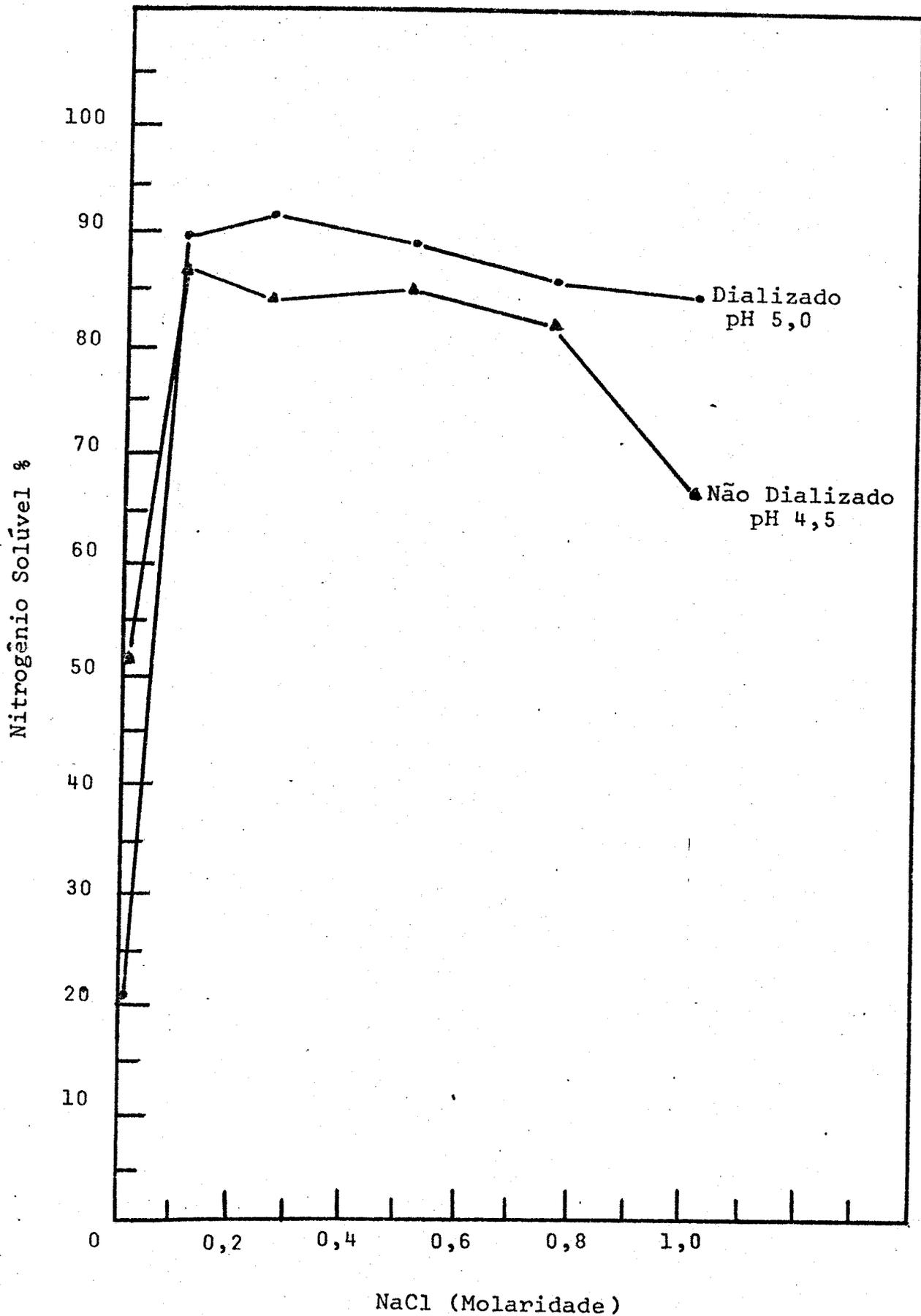


Figura 3 . Solubilidade das Proteínas do Plasma.  
Efeito de Diferentes Concentrações de  
NaCl



#### 4.4. Conteúdo de proteínas tipo albuminas e globulinas na proteína do plasma.

Os resultados obtidos sobre os conteúdos de albuminas e globulinas na proteína do plasma, pela dissolução em solução salina, seguida de diálise em água destilada, indicam que aproximadamente 54% das proteínas pertencem às albuminas e 46% às globulinas.

Cabe notar que a classificação das proteínas pela sua solubilidade, em albuminas e globulinas, é relativa, pois existe uma superposição importante de propriedades entre ambos os grupos, portanto, esta determinação por outros métodos (eletroforese, precipitação fracionada, etc.) (9) poderá mostrar resultados diferentes dos obtidos aqui.

#### 4.5. Determinação de aminoácidos no plasma.

Para a determinação da composição em aminoácidos do plasma, utilizou-se o plasma dializado, seguindo-se o método descrito em 3.2.5. A composição encontrada está representada no Quadro 6. Os valores foram expressos em gramas de aminoácidos por 16 gramas de Nitrogênio.

Inclue-se no mesmo Quadro, para fins de comparação, a composição em aminoácidos da referência teórica para as exigências humanas, segundo o comitê da F.A.O. (7).

QUADRO 6 . Composição em Aminoácidos das Proteínas  
contidas no Plasma.

( g de aminoácido / 16 g de Nitro-  
gênio).

Amostra	Plasma Dializado	Padrão da F.A.O.
Lisina	8,2	4,2
Histidina	2,4	
Amônia	2,1	
Arginina	6,0	
Ácido Aspártico	14,7	
Treonina	7,3	2,8
Serina	9,7	
Ácido Glutâmico	25,6	
Prolina	6,3	
Glicina	5,0	
Alanina	6,8	
1/2 Cistina	3,9	2,0
Valina	7,8	4,2
Metionina	2,3	2,2
Isoleucina	3,9	4,2
Leucina	11,3	4,8
Tirosina	4,8	2,8
Fenilalanina	5,4	2,8
Triptofano	1,6	1,4

A análise da composição em aminoácidos (Quadro 6 ) pelo índice proteico (Protein Score), tomando como referência o padrão da F.A.O., mostra que a isoleucina é o único aminoácido limitante, no entanto, não se encontra em situação crítica, já que representa 93% da exigência da F.A.O. para isoleucina.

Para os demais aminoácidos obtiveram-se valores elevados, notadamente acima dos valores tomados como referência. A lisina, um aminoácido muito importante para o crescimento, encontra-se em excesso, atingindo o valor de 195% em relação ao padrão.

#### 4.6. Digestibilidade enzimática "in vitro".

Os resultados da digestibilidade das proteínas do plasma estão expressas no Quadro 7 como a quantidade de Nitrogênio - solúvel em solução 12% de ácido Tricloralético (TCA) em relação ao Nitrogênio total, presente na amostra original.

QUADRO 7 Digestibilidade da Proteína do Plasma

Amostra	% Digestibilidade
	$\left( \frac{N \text{ solúvel}}{N \text{ total}} \times 100 \right)$
Caseína	96
Plasma dializado	92
Plasma não dializado	83

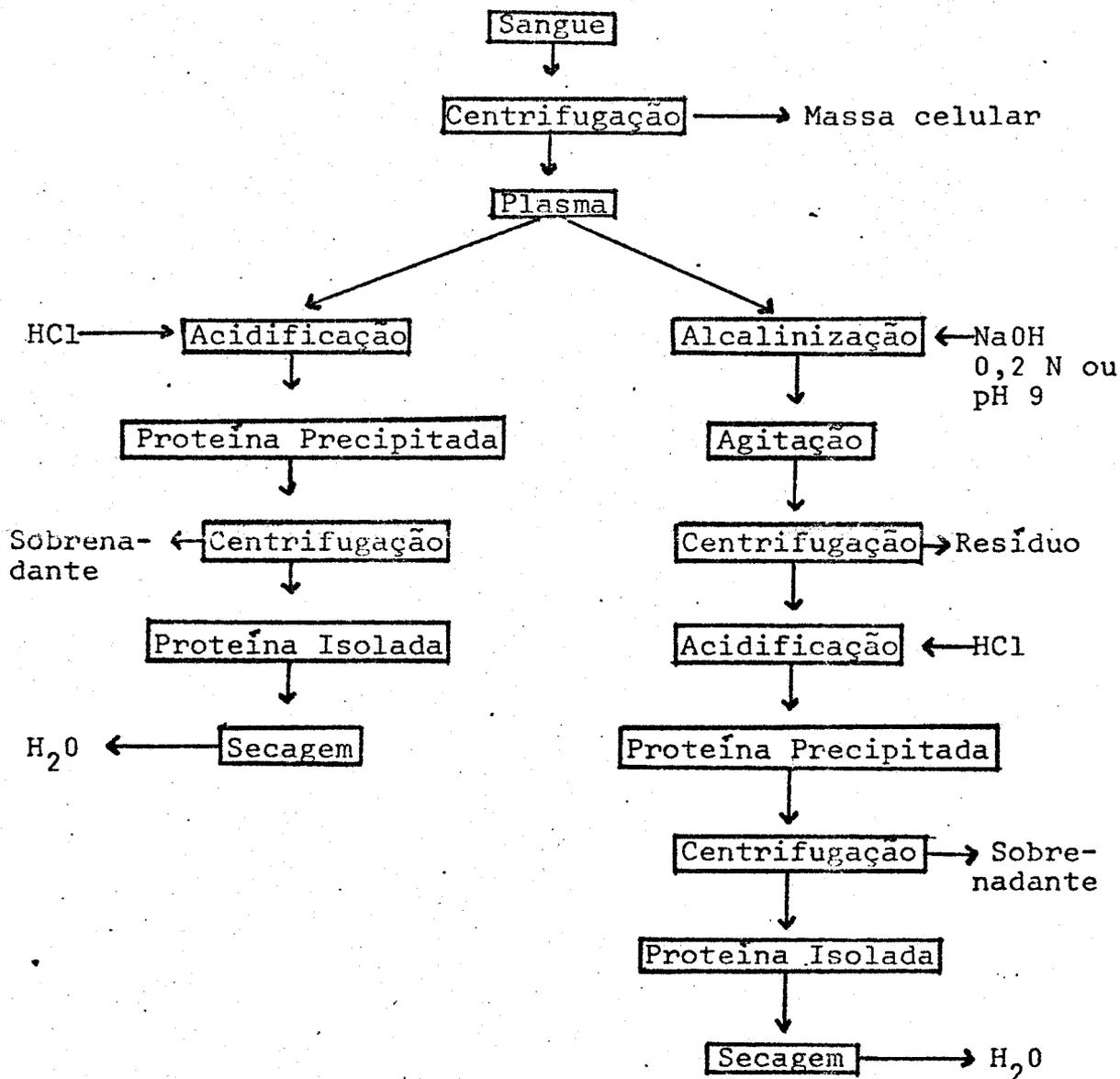
Observa-se no Quadro 7 que o plasma não dializado apresenta o menor valor de digestibilidade protéica. Esse efeito pode ser atribuído ao fato de que essa amostra contém alta porcentagem de sais, o qual pode influir na susceptibilidade do ataque enzimático. A digestibilidade da proteína, no plasma dializado - foi de 92% valor que é comparável com a digestibilidade da caseína, obtido nas mesmas condições que as amostras. Uma alta digestibilidade das proteínas, significa que seu aproveitamento pelo organismo será maior, considerando-se em geral, que uma proteína com digestibilidade acima de 90% será facilmente absorvida pelo organismo.

#### 4.7. Isolamento das proteínas do plasma.

O plasma, obtido depois da separação da massa celular, con

têm em solução aproximadamente 3% de proteína bruta. Com a finalidade de isolar a proteína do plasma, obtendo alto rendimento, foram conduzidos diferentes testes, como indicado em 3.2.7. Para estes testes foi tomado como pH de mínima solubilidade - aquele que corresponde ao valor encontrado nos estudos de solubilidade do plasma não dializado, liofilizado, sendo este valor o pH 4,5. Na Figura 4 está apresentada a sequência de operações seguida no isolamento da proteína.

FIGURA 4 . Diagrama de Fluxo das Operações Empregadas no Isolamento das Proteínas do Plasma.



Notou-se que ao se acidificar o plasma, fortemente alcalino - (2N NaOH) ocorre um desprendimento de  $H_2S$ , detectável pelo seu cheiro característico, este fato pode explicar a alta recupera

ção no isolamento da proteína, indicando que as proteínas sofreram alguma modificação no meio fortemente alcalino, facilitando sua precipitação no pH de mínima solubilidade, ou seja - pH 4,5.

No Quadro 8 estão apresentadas as porcentagens de recuperação obtidas em cada caso, reportadas como porcentagem de proteína recuperadas em relação à proteína bruta presente no plasma.

QUADRO 8 . Porcentagem de Recuperação no Isolamento da Proteína.

% de proteína no plasma líquido: 2,94%

Volume empregado em cada teste: 1000 ml do plasma.

Amostra	Alcalinizante	Prot. no plasma (N x 6,25) (g)	Proteína recuperada	% Recuperação
Plasma líquido	NaOH 0,2N	29,37	25,6	87,2
Plasma líquido	NaOH pH 9	29,37	5,8	19,6
Plasma líquido	-	29,37	5,1	17,4

Estes resultados permitem concluir que o melhor rendimento foi conseguido com a alcalinização do plasma à concentração de 0,2 N NaOH, precipitando-se posteriormente as proteínas no pH de mínima solubilidade.

Este método proporciona uma outra opção na obtenção das pro-

teínas do plasma, sendo um processo simples e com alto rendimento da proteína isolada, no entanto, os efeitos nutricionais das proteínas assim obtidas deverão ser estudados. Nestes testes foram estudadas somente a recuperação obtida em cada caso, e o conteúdo de aminoácidos na proteína para a qual obtivemos maior porcentagem de recuperação.

#### 4.8. Conteúdo de aminoácidos na proteína isolada.

Na proteína isolada que apresentou a maior porcentagem de recuperação, foi determinada a composição de aminoácidos, utilizando-se o mesmo método descrito em 3.2.5.

No Quadro 9 encontra-se a composição em aminoácidos da proteína isolada. Incluiu-se no mesmo quadro para fins de comparação, a composição em aminoácidos do plasma não dializado, liofilizado e também, a referência teórica da F.A.O.

QUADRO 9 . Composição em Aminoácidos da Proteína Isolada,  
do Plasma Dializado e da referência da FAO).

( g de aminoácidos / 16 de Nitrogênio )

Aminoácido	Prot.isolada NaOH 0,2 N	Plasma dial. liof.	F.A.O.
Lisina	8,4	8,2	4,2
Histidina	2,2	2,4	
Amônia	1,6	2,1	
Arginina	5,6	6,0	
Ácido Aspártico	13,1	14,6	
Treonina	6,0	7,2	2,8
Serina	8,0	9,7	
Ácido Glutâmico	24,9	25,6	
Prolina	5,6	6,3	
Glicina	4,2	5,0	
Alanina	5,8	6,8	
1/2 Cistina	0,9	3,9	2,0
Valina	6,1	7,8	4,2
Metionina	2,3	2,3	2,2
Isoleucina	3,9	3,9	4,2
Lêucina	9,8	11,3	4,8
Tirosina	4,3	4,8	2,8
Fenilalanina	4,8	5,4	2,8

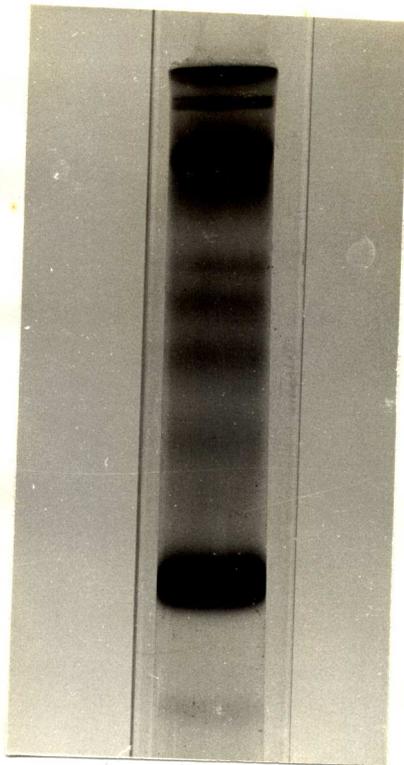
Analizando-se o Quadro 9 verifica-se que existem algumas diferenças entre a composição da proteína isolada e a do plasma-dializado liofilizado.

Nota-se que na proteína isolada se produz uma grave destruição da cistina, isto pode ser atribuído ao fato de ter-se submetido o plasma a alta alcalinidade, sofrendo as proteínas alguma modificação.

#### 4.9. Eletroforese em Gel de poliacrilamida.

Com a finalidade de se obter um padrão eletroforético das proteínas do plasma, efetuou-se eletroforese em gel de poliacrilamida, obtendo-se os resultados que aparecem na Foto nº 1.

FOTO nº 1. Eletroforese em Poliacrilamida das Proteínas do Plasma.



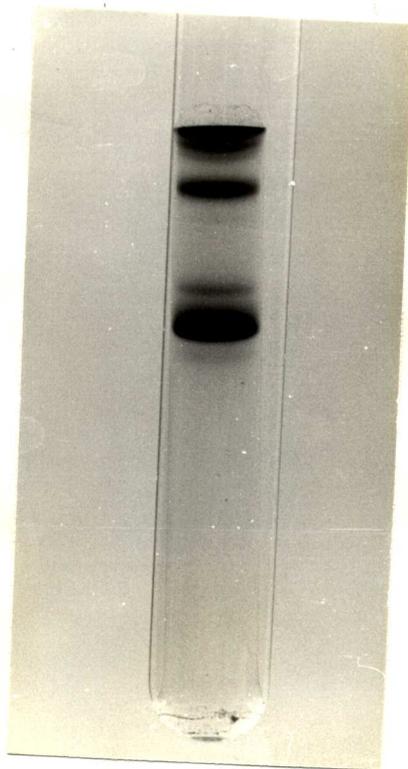
O eletroforetograma obtido revela que 9 frações protéicas com diferentes mobilidades podem ser separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, em tampão tris-glicina pH 8,2 - 8,4.

#### 4.10. Eletroforese em gel contendo uréia:

A eletroforese em gel contendo uréia é empregada para a determinação das unidades estruturais da proteína, as quais poderão ser obtidas por dissociação da estrutura quaternária, pela ação da uréia.

Na Foto nº 2 se apresenta o eletrofonetograma do plasma, obtido na eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 10 M de uréia.

FOTO nº 2. Eletroforese do Plasma em Gel de Poliacrilamida contendo 10 M de Uréia.



Por este método, observa-se, na Foto nº 2, a separação de 5 bandas no gel, indicando a existência de pelo menos, 5 diferentes unidades estruturais na proteína.

#### 4.11. Eletroforese em gel contendo Dodecil sulfato de sódio, (SDS).

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS proporciona um método simples e efetivo para se estimar o peso molecular das subunidades da proteína.

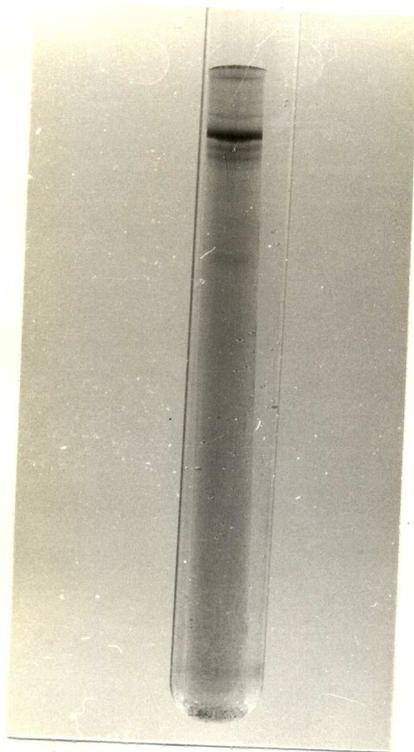
As proteínas quando expostas a SDS e mercaptoetanol são fracionadas nos seus monômeros, determinando-se suas mobilidades eletroforéticas é possível conhecer seus pesos moleculares, já que existe uma relação direta entre a mobilidade relativa e o logaritmo do peso molecular (34).

Na Figura 5 está representada a curva padrão utilizada para a determinação do peso molecular, sendo feita nas mesmas condições que as amostras, segundo o método indicada em 3.2.10.

O peso molecular dos padrões (albumina de sêro bovino, 68.000; pepsina, 35.000; desidrogenase lática, 36.000; lisozima, 14.000), foi tomado da literatura (34) e o das amostras foram calculados por interpolação na curva padrão.

Na Foto nº 3 é apresentado o eletroforetograma das proteínas do plasma, onde se observa a separação de 9 bandas, correspondentes às subunidades das proteínas. A mobilidade relativa e o peso molecular estão indicados no Quadro 10.

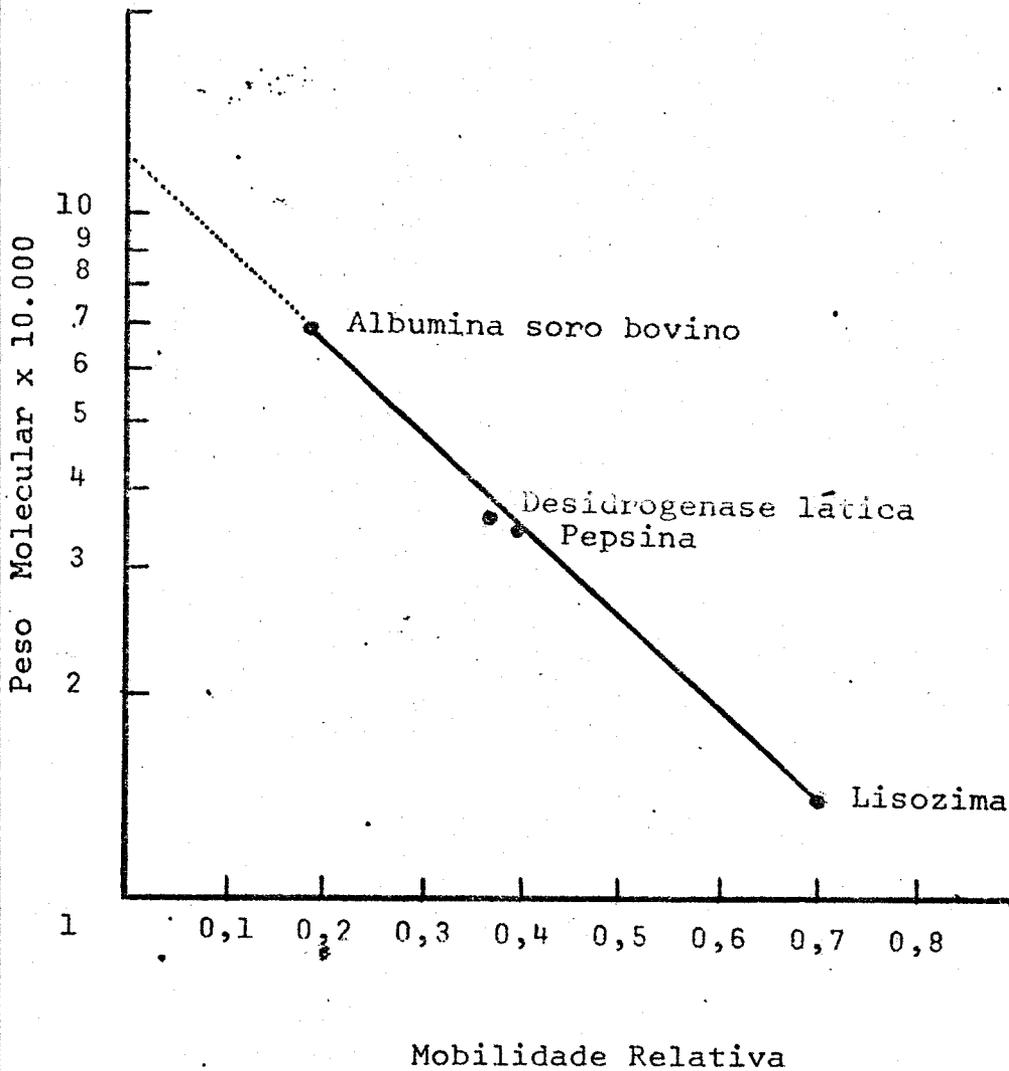
FOTO nº 3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida  
contendo Dodecil Sulfato de Sódio.



Observa-se no eletroforetograma que as mobilidades das subunidades das proteínas do plasma encontram-se muito próximas, sendo a fração 9 que possui maior mobilidade, e portanto, menor peso molecular.

Figura 5 . Determinação do Peso Molecular

Curva Padrão



QUADRO 10 . Determinação do Peso Molecular em SDS-Poliacrilamida das Subunidades da Proteína do Plasma.

Frações	Mobilidade Relativa	Peso Molecular
1	0,023	115.000
2	0,046	105.000
3	0,069	90.000
4	0,12	83.000
5	0,16	73.000
6	0,21	64.000
7	0,23	60.000
8	0,25	56.000
9	0,53	24.000

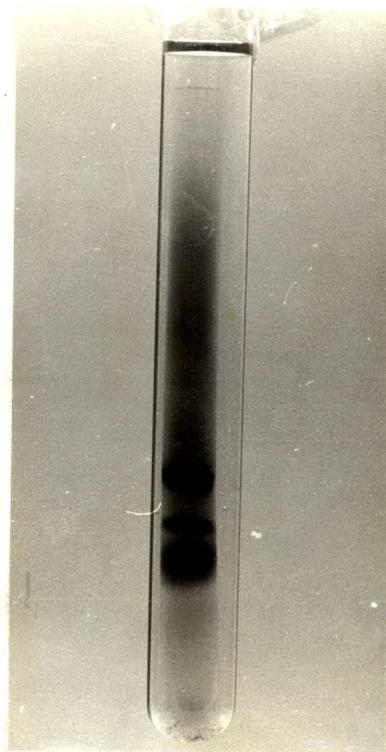
Em geral, se observa que o peso molecular das subunidades das proteínas do plasma, encontram-se entre 24.000 e 115.000, aproximadamente.

#### 4.12. Eletrofocalização em gel,

A focalização em gel ou "gel electrofocusing" é obtido aplicando uma corrente elétrica em um sistema eletrolítico, no qual existe um gradiente de pH, que aumenta do anodo para o catodo. A presença de "ampholines" no sistema proporciona um gradiente de pH suficientemente estável durante o experimento. Os componentes da proteína estudada, que permanecem distribuídos no gel, se focalizarão no ponto onde o pH é igual ao seu ponto isoelétrico (36).

Por este método foram obtidas 3 bandas, revelando 3 frações das proteínas do plasma, com diferentes pontos isoelétricos. Na Foto nº 4 e no Quadro 11 estão apresentados os resultados obtidos na eletrofocalização em gel, das proteínas do plasma.

FOTO nº 4. Eletrofocalização em Gel das Proteínas do Plasma.



QUADRO 11. Ponto Isoelétrico dos Componentes do Plasma Obtidos por Focalização em Gel.

Frações	P.I.
1	5,7
2	5,3
3	4,8

Observou-se que o terceiro componente, obtido na eletrofocalização em gel, se encontra em maior quantidade que os outros, evidenciando que muitas das proteínas do plasma tem seu ponto isoelétrico no pH 4,8.

4.13. Avaliação nutricional do plasma dializado e não dializado.

Os resultados obtidos na determinação dos valores de PER (quociente de eficiência protéica) das proteínas dos plasmas, realizada segundo o método descrito em 3.2.12., são apresentados no Quadro 12.

QUADRO 12 . Avaliação Nutricional do Plasma.

Os resultados representam os valores médios de cada grupo de ratos.

Peso inicial médio dos grupos: 38,1 ± 2,65 g.

Alimentação "ad libitum" durante 28 dias.

Dieta	Peso ganho (g)	Proteína consumida (g)	PER	Correção Caseína 2,5
Caseína	106,66	39,56	2,70 <sup>±</sup> 0,44	2,5
Plasma dializado	88,96	29,50	3,02 <sup>±</sup> 0,39	2,8
Plasma não dializado	80,36	28,70	2,80 <sup>±</sup> 0,39	2,6

Analizando o Quadro 12 observa-se que o nível de aceitabilidade de ambos os plasmas é bom, uma vez que os animais comeram quantidades semelhantes dos dois tipos de plasma e não muito diferentes da caseína, levando-se em consideração que os grupos alimentados com caseína tiveram um crescimento maior, por terem consumido também maior quantidade de proteína.

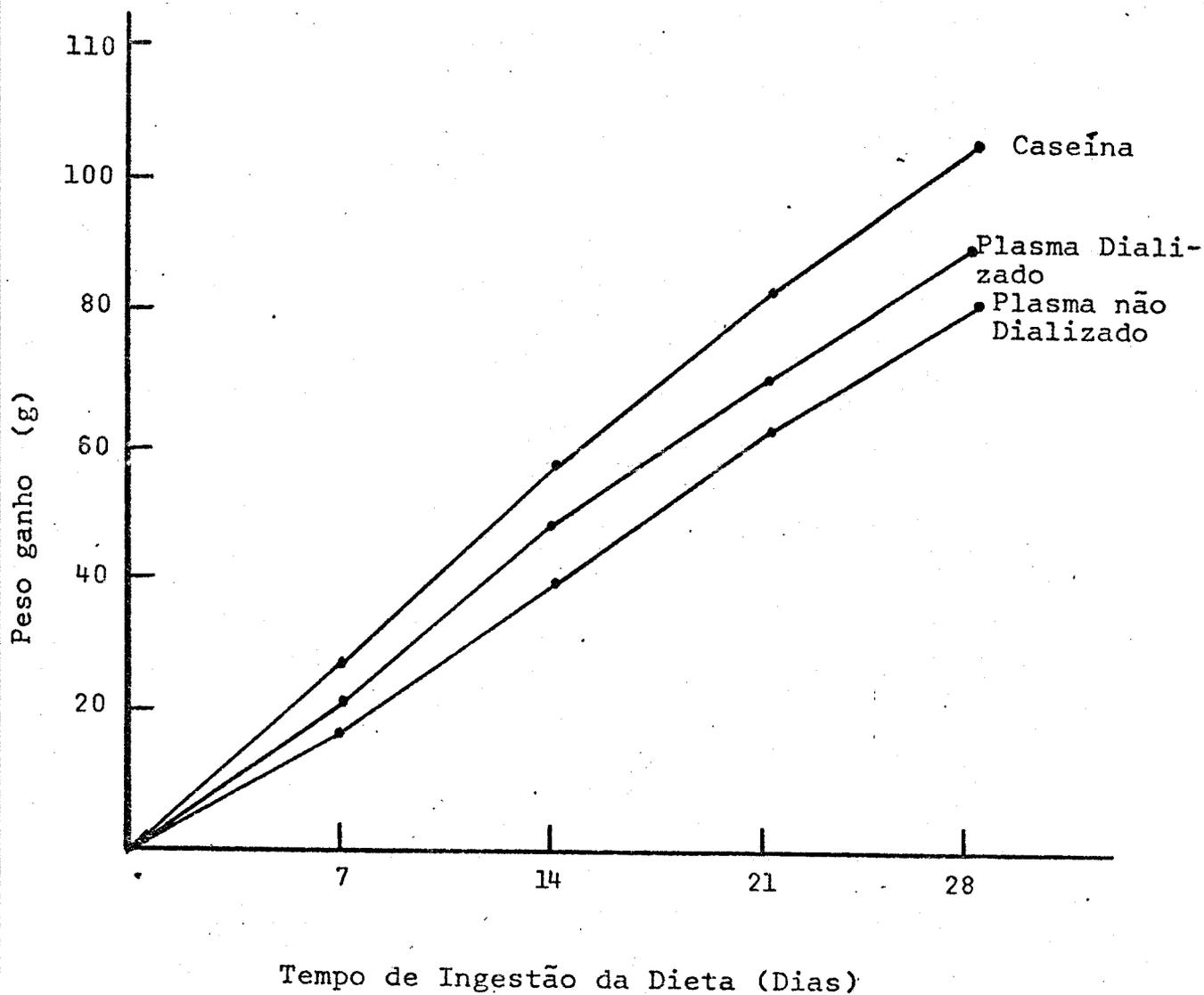
Os valores de PER encontrados mostram que as proteínas de ambos os plasmas, comparados com a caseína, apresentam um valor biológico ligeiramente maior.

Comparando-se com os valores de PER obtidos por Young e col. (37) para o plasma bovino desalinizado e seco por

"spray drying", verifica-se que o valor encontrado para o plasma de frango, dializado e liofilizado, é igual. Delaney (1) - no seu estudo sobre o valor nutritivo do plasma porcino, concentrado por ultrafiltração e seco por "spray drying", utiliza o método de NPU, encontrando o valor de 65,8, comparando com o valor de 72,1 para caseína. Com estes resultados conclui que as proteínas do plasma porcino são de alto valor nutritivo, no entanto em grau menor que a caseína.

Na Figura 6 estão apresentadas as curvas de crescimento dos ratos utilizados nos ensaios biológicos. Na elaboração do gráfico utilizou-se apenas os ganhos de pesos médios dos grupos, que foram graficados em função do tempo que receberam as diferentes dietas.

Figura 6 . Curvas de Crescimento Médio dos Ratos Alimentados com as Dietas de Caseína, Plasma Dializado e Plasma não Dializado.



Cada ponto representa a média de ganho de peso de cada grupo de ratos.

O peso inicial de cada grupo ( $3,81 \pm 2,65g$ ) considerou-se como zero neste gráfico.

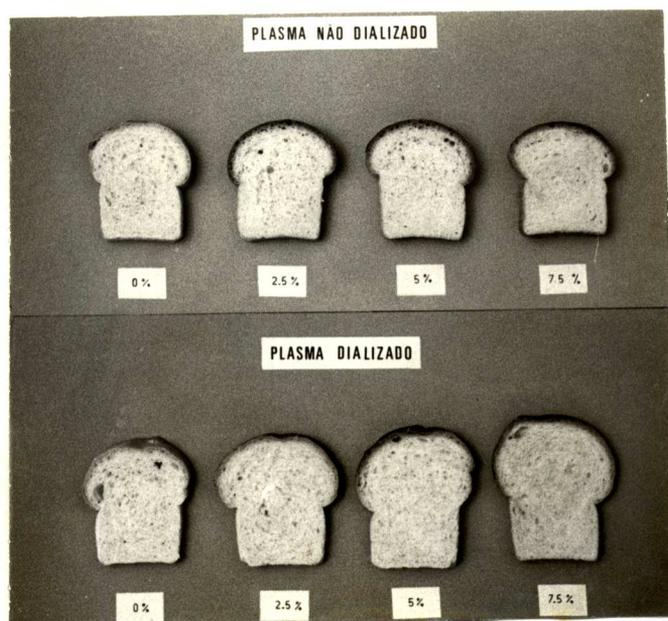
Nas curvas de crescimento se observa que não existe uma grande diferença no aumento de peso médio dos ratos alimentados com a dieta de caseína e os ratos alimentados com a dieta de plasma-dializado, sendo que no final do experimento o peso ganho médio dos animais alimentados com caseína tiveram uma diferença de 17,7 g em relação ao peso ganho pelos ratos alimentados com plasma dializado. Esta diferença é maior (26,9) em relação aos ratos alimentados com plasma não dializado. No entanto, deve-se levar em conta que os níveis de proteína consumida foram menores para o plasma não dializado.

Estes resultados, obtidos nos ensaios biológicos, mostram que o valor biológico das proteínas do plasma de frango é comparável com o da caseína, considerada como proteína de alta qualidade.

4.14. Efeito de diferentes concentrações de plasma dializado - ou não dializado na elaboração e na qualidade do pão. O estudo de panificação, adicionando plasma na elaboração do pão de fôrma, foi conduzido para explorar uma das muitas formas possíveis de utilização do plasma na alimentação humana, estabelecendo-se seus efeitos e sua influência no valor nutritivo do produto final.

Na Foto nº 5 e nos Quadros 13 e 14 estão apresentados os resultados dos efeitos no volume obtidos com o pão normal, (controle) e com a adição de 2,5; 5,0 e 7,5% de plasma dializado ou não dializado, em relação à farinha, na formulação do pão. Os pães elaborados com os plasmas apresentaram o miolo de cor ligeiramente amarela, sendo imperceptível na concentração de 2,5% de plasma. Observou-se que com a adição de plasma não dializado na concentração de 2,5% com relação à farinha, o volume específico permanece igual ao controle, diminuindo à medida que aumenta a concentração do plasma. O efeito contrário foi observado com a adição de plasma dializado, sendo que o volume específico do pão é aumentado à medida que se aumenta a concentração de plasma no pão.

FOTO nº 5. Efeito de Diferentes Concentrações de Plasma Dializado e não Dializado no Volume do Pão.



QUADRO 13. Efeito de Diferentes Concentrações de Plasma não Dializado no Volume do Pão.

Concentração de plasma %	Peso g	Volume cc.	Volume específico
0	133,64	650	4,86
2,5	133,88	650	4,85
5,0	134,12	625	4,66
7,5	135,48	550	4,06

QUADRO 14 . Efeito de Diferentes Concentrações de Plasma Dializado no Volume do Pão.

Concentração de plasma %	Peso g	Volume cc.	Volume específico
0	137,01	675	4,93
2,5	136,60	700	5,12
5,0	131,02	700	5,34
7,5	133,97	750	5,60

#### 4.15. Avaliação da qualidade do pão.

A avaliação subjetiva de algumas das qualidades dos pães, elaborados com a adição de plasma dializado ou não dializado, nas diferentes concentrações, paralelamente com o pão tomado - como controle, foi feita pelo Laboratório de Panificação da Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Os resultados obtidos estão apresentados nos Quadros 15 e 16. No Quadro 15 observa-se que a contagem total das características - externas e internas, aroma e gosto dos pães elaborados com 2,5% de plasma não dializado, com relação à farinha, é praticamente igual à contagem total encontrada para o pão usado como controle, elaborado só com farinha de trigo com 72% de extração. Estes valores totais são apreciavelmente diminuídos à medida que se aumenta a concentração de plasma não dializado na formulação, encontrando-se os menores valores na concentração de 7,5 de plasma não dializado.

No Quadro 16 pode-se observar que com a adição de 2,5% de plasma dializado, com relação à farinha, as características externas e internas do pão, são semelhantes às características do controle, diminuindo os valores com respeito a aroma e gosto. Nas concentrações de 5 e 7,5% de plasma dializado, observa-se uma diminuição na contagem total das características favoráveis do pão, sendo que os menores valores se encontram na concentração de 7,5% de plasma dializado.

Os pães elaborados com o plasma dializado ou não dializado, apresentaram o miolo de cor ligeiramente amarelada e um aroma semelhante ao chamado "pão de ovo". Na concentração de 2,5% dos plasmas dializado e não dializado, esta cor e aroma são praticamente imperceptíveis.

Em geral, pode-se dizer, com os resultados destes testes, que os pães elaborados com plasma dializado ou não dializado na con

centração de 2,5% com relação à farinha apresentam características externas, internas, de aroma e de gosto que não diferem apreciavelmente das características do pão elaborado só com farinha.

É necessário, ainda, efetuar testes de aceitabilidade dos pães enriquecidos com plasma, já que, a avaliação da qualidade do pão fornece dados sobre as características externas, internas, de aroma e gosto, o que não indica se os pães são aceitos ou não a nível de consumidor.

QUADRO 15 .Avaliação da Qualidade dos Pães Elaborados com Diferentes Concentrações de Plasma não Dializado.

% Plasma não Dializado

	Valor Máximo	0	2.5	5	7.5
<u>Características Externas</u>					
Volume:(vol.=cm <sup>3</sup> /g.x 3.33)	20	16.2	16.15	15.5	13.5
Côr da Crosta: (Fatores indesejáveis:não uniforme,opaco,muito claro ou muito escuro).	10	7	8	6	4
Quebra: (Fatores indesejáveis:muito pequena,áspera,desigual).	5	2	2.5	2.5	3
Simetria: (Fatores indesejáveis:laterais,pontas e parte superior desiguais).	5	4	4	4	3.5
TOTAL	40	29.2	30.65	28	29
<u>Características Internas</u>					
Características da Crosta: (Fatores indesejáveis:borrachenta,quebradiça,dura,muito grossa,muito fina).	5	4	4.5	3	2
Côr do Miolo: (Fatores indesejáveis:cinza,opaca, desigual,escura).	10	8	8	6	3
Estrutura da célula do miolo: (Fatores indesejáveis:falta de uniformidade,buracos muito abertos ou compacto).	10	7	8	6	4
Testura do miolo: (Fatores indesejáveis:falta de uniformidade,desigualdade,áspera, compacto,seco).	10	7	7	6	5
TOTAL	35	26	27.5	21	14
<u>Aroma e Gosto</u>					
Aroma: (Fatores indesejáveis: falta de aroma,aroma desagradável, estranho,muito fraco ou forte).	10	8	6	5	2
Gosto: (Fatores indesejáveis: ácido, estranho,goma, massa,gosto remanescente).	15	13	12	8	5
TOTAL	25	21	18	13	7
Contagem Total	100	76.2	76.15	62	50

QUADRO 16. Avaliação da Qualidade dos Pães Elaborados com Diferentes Concentrações de Plasma Dializado.

	% Plasma Dializado				
	Valor Máximo	0	2.5	5	7.5
<b>Características Externas</b>					
Volume: (vol.=cm <sup>3</sup> /g.x 3.33) peso: vol.:cm <sup>3</sup> /g.	20	16.3	17.8	17.8	18.6
Côr da Crosta: (Fatores indesejáveis:não uniforme, opaco, muito claro ou muito escuro).	10	8	8	8	8
Quebra: (Fatores indesejáveis:muito pequena, áspera, desigual).	5	2	2.5	3	2.5
Simetria: (Fatores indesejáveis:laterais, pontas e parte superior desiguais).	5	4	4	4	4
TOTAL	40	30.3	32.3	32.8	33.1
<b>Características Internas</b>					
Características da Crosta: (Fatores indesejáveis:borrachenta, quebradiça, dura, muito grossa, muito fina).	5	3.5	3.5	4	4
Côr do Miolo: (Fatores indesejáveis:cinza, opaca, desigual, escura).	10	8	6	4	3
Estrutura da célula do miolo: (Fatores indesejáveis:falta de uniformidade, buracos muito abertos ou compacto).	10	8	8	8	7
Testura do miolo: (Fatores indesejáveis:falta de uniformidade, desigualdade, áspera, compacto, seco).	10	7	8	7	6
TOTAL	35	26.5	25.5	23	20
<b>Aroma e Gosto</b>					
Aroma: (Fatores indesejáveis: falta de aroma, aroma desagradável, estranho, muito fraco ou forte).	10	8	6	6	4
Gosto: (Fatores indesejáveis:ácido estranho, goma, massa, gosto remanescente).	15	12	10	8	8
TOTAL	25	20	16	14	12
Contagem Total	100	76.8	73.8	69.8	65.1

#### 4.16. Avaliação nutricional do pão elaborado com plasma dializado.

Para o estudo do efeito nutricional da adição de plasma dializado nas concentrações de 2,5 e 5% em relação à farinha na formulação do pão, foram feitos ensaios biológicos com ratos tipo Wistar com 21 - 25 dias de idade ( $44 \pm 1,29$ g) no início do ensaio, empregando-se o método de PER, como indicado em 3.2.15.

Considerou-se somente o pão elaborado com a adição de plasma dializado, em vista de ter-se obtido valores de PER muito semelhantes para ambos os plasmas, esperando-se portanto, também valores semelhantes na suplementação do pão quando adicionadas quantidades equivalentes de proteína do plasma dializado ou não dializado.

No Quadro 17 estão apresentadas as porcentagens de proteína total contida nos pães controle e os elaborados com 2,5 e 5% de plasma dializado.

QUADRO 17 . Conteúdo de Proteína nos Pães Controle e com 2,5 e 5% de Plasma Dializado.

% Plasma na Farinha	Porcentagem de Proteína no Pão ( base seca )
0 (controle)	10,84 (N x 5,7)
2,5	12,84 (N x 5,8)
5,0	14,83 (N x 5,9)

Observa-se no Quadro 17 que o conteúdo de proteína no pão com 2,5% de plasma aumentou em 18,5% e com 5% de plasma o aumento foi de 36,8%, comparado com o pão normal ou controle.

No Quadro 18 estão representados os resultados de PER obtidos nos ensaios biológicos para as diferentes dietas de pão, e na Figura 7 encontram-se as curvas de crescimento médio dos grupos de 6 ratos com peso inicial médio de  $44 \pm 1,29$  g, alimentados com as dietas de pão. Se graficou o peso ganho médio dos grupos contra o tempo de ingestão da dieta.

QUADRO 18. Avaliação Nutricional do Pão Elaborado com 0, 2,5 e 5% de Plasma Dializado.

Os resultados representam os valores médios de cada grupo de ratos.

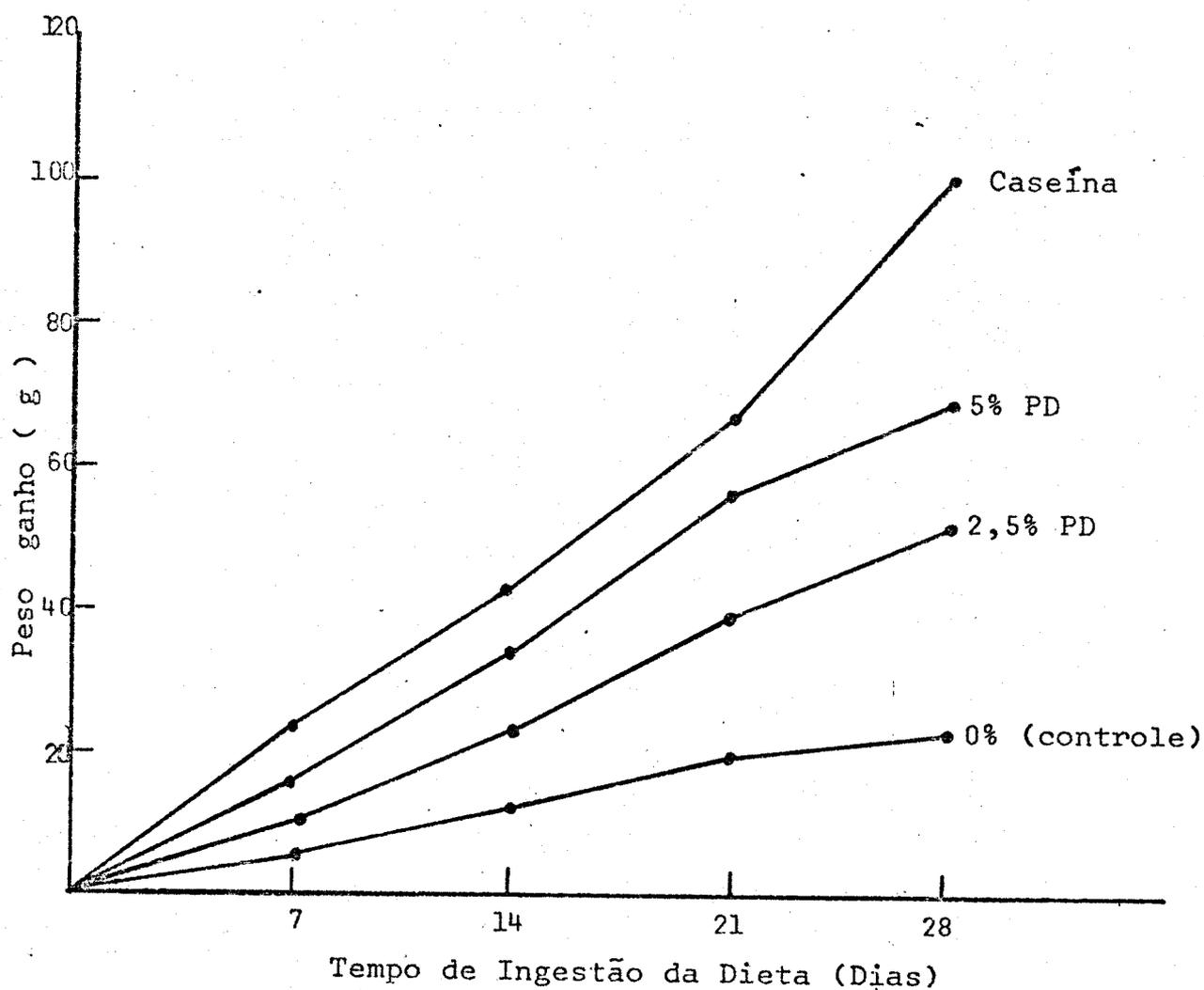
Peso inicial médio dos grupos:  $44 \pm 1,29$  g.

Alimentação "ad libitum" durante 28 dias.

Dieta	Peso ganho (g)	Proteína consumida (g)	PER $\pm$ d.p.	Correção Caseína 2,5
Caseína	101,13	37,53	$2,69 \pm 0,41$	2,50
Pão controle	22,9	24,85	$0,92 \pm 0,07$	0,86
Pão 2,5% plasma	51,37	29,20	$1,76 \pm 0,06$	1,64
Pão 5,0% plasma	68,87	31,77	$2,17 \pm 0,11$	2,02

Observa-se no Quadro 18 que o enriquecimento do pão com 2,5% de plasma, aumenta o valor de PER no pão comum de 0,86 para 1,64; adicionando-se 5% de plasma, este valor eleva-se até 2,02. Comparando-se com o valor de PER da caseína, se observa que o valor biológico do pão feito só com farinha de trigo é muito baixo, aumentando-se notavelmente com a adição de 2,5 e 5% de plasma dializado na sua elaboração.

Figura 7 . . . Curvas de Crescimento dos Ratos Alimentados com as Dietas de Pão.



Cada ponto representa a média de ganho de peso de cada grupo. O peso inicial médio de cada grupo ( $44 \pm 1,29g$ ) considerou-se como zero neste gráfico.

Na Figura 7 observa-se a grande diferença no aumento de peso médio dos ratos em função das diferentes dietas ingeridas, evidenciando-se que a adição de 5% de plasma dializado no pão aumenta consideravelmente seu valor biológico, sendo que mesmo com a adição de somente 2,5% de plasma, o crescimento dos ratos é notadamente aumentado, devendo-se levar em conta que o nível de proteína consumida pelo grupo da caseína foi bem maior que aquela consumida pelos grupos das dietas de pão.

Considerando-se o alto conteúdo de lisina nas proteínas do plasma, e conhecendo a deficiência deste aminoácido na proteína do trigo, (7), pode-se explicar o fato do aumento do valor biológico do pão quando enriquecido com plasma, conseguindo-se com a combinação de ambas as proteínas um melhor balanceamento dos aminoácidos e conseqüentemente um maior aproveitamento pelo organismo das proteínas existentes no trigo. Considera-se que aproximadamente 40% das proteínas totais da farinha de trigo não são aproveitadas pelo organismo, por causa do aminoácido essencial limitante lisina (18). Inúmeras pesquisas tem sido feitas sobre a fortificação do pão com lisina ou com proteínas ricas em lisina visando uma melhoria da qualidade nutritiva das proteínas do trigo.

Comparando os dados de PER obtidos, com os dados fornecidos por Gates e Kennedy (17), encontra-se que o PER do pão com 2,5% de plasma é semelhante ao PER (1,7) do pão enriquecido com 0,25% de cloreto de L-lisina mono-hidratado e 3% de leite em pó desnatado. Hoover (22) obtém valores de PER de 1,84 para o pão enriquecido com 12% de soja, valor que se supera com o pão contendo 5% de plasma. Santa Maria (27) reportou que a adição de 10% de concentrado proteico de peixe, em bolachas, elevou o valor de PER de 0,86 a 2,3. Observou-se que para se alcançar os valores de PER mencionados pelos autores, são necessárias pequenas quantidades do plasma no pão.

O enriquecimento do pão com baixas quantidades de plasma diali-

zado (2,5 , 5%), segundo os resultados obtidos, demonstraram um efeito notável no aumento do valor biológico. Portanto, seria interessante estabelecer a concentração ótima de proteínas de plasma necessária para alcançar o balanço mais adequado entre os aminoácidos na mistura.

A conclusão que se pode tirar destes resultados obtidos, relacionados com a utilização do plasma seco, é que, além de seu em prego em panificação poderá ser utilizado também no enriquecimen to de outros alimentos à base de cereais, cujas proteínas são deficientes em lisina.

## 5. CONCLUSÕES.

1. O anticoagulante mais efetivo para o sangue de frango, e que ao mesmo tempo não produz hemólise, é a solução de citrato de sódio, na concentração final de 0,5%.
2. Mediante a diálise do plasma, pode-se obter uma redução significativa no conteúdo de sais e um aumento no conteúdo de proteína do plasma.
3. Um aumento considerável na solubilidade das proteínas do plasma, no pH de mínima solubilidade, pode ser obtido na presença de 0,1 ou 0,25 M de NaCl.
4. As proteínas do plasma de frango estão constituídas, aproximadamente por 56% de albuminas e 44% de globulinas.
5. O único aminoácido limitante das proteínas do plasma é a isoleucina.
6. A proteína isolada sob diferentes condições de pH difere quanto à porcentagem de recuperação, sendo recomendada a alcalinização do plasma a 0,2 N de NaOH e posteriormente precipitação das proteínas no seu pH de mínima solubilidade, para obter a maior recuperação de proteína.
7. A alcalinização do plasma até 0,2 N de NaOH, durante 2 horas, produz a destruição de cistina.
8. As proteínas do plasma apresentaram 3 frações proteicas com pontos isoelétricos nos pH's 5,7; 5,3 e 4,8, por eletrofoculação em gel separando-se no pH 4,8 a maior quantidade de proteína.

9. Os valores de PER do plasma dializado ou não dializado são ligeiramente superiores à caseína, verificando-se um alto - valor biológico para as proteínas do plasma de frango.
10. Do ponto de vista nutricional não foram observadas diferenças consideráveis entre o plasma dializado e o não dializado, embora o não dializado tivesse apresentado "in vitro" - uma digestibilidade mais baixa.
11. O enriquecimento de pão comum, (farinha de trigo pura) com o plasma de frango, aumenta notadamente o valor biológico, evidenciando-se uma complementação entre os aminoácidos das proteínas do trigo e as proteínas do plasma.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES. 1964. Gel electrophoresis. 121:305.
2. AKERS, J.M. 1973. Utilization of blood. Fd. Manufacture 4:31.
3. AKESON, W.R. and STAHAMANN, M. 1964. A pepsin digest index of protein quality evaluation. J. Nutr. 83:257.
4. A.O.A.C. 1970. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemist. 11th. Ed. Washington, D.C.
5. BATES, R.P., WU, L.I. and MURPHY, B. 1974. Use of animal blood and cheese whey in bread. Nutritive value and acceptance. J. of Fd. Sci. 31:385.
6. BECKMAN. (s.d.). Model 120C amino acids analyzer instruction manual. Spinco Division Beckman Instruments, Inc. Stanford Industrial Park, Palo Alto, California.
7. BENDER, A.E. 1967. Dietetic Foods, Chemical Publishing Co., New York.
8. BREYER, B. and GOODWIN, P.B. 1962. The emulsifying capacity of blood sera. Clin. Chem. Acta 5:647.
9. CANTAROW, A. and SCHEPARTZ, B. 1967. Bioquímica. Interamericana, S.A. México, D.F.
10. CRISTOL, P. and MONNIER, P. 1936. Deproteinization of serum by trichloroacetic acid for the determination of total non protein nitrogen. Compt. rend. soc. biol. 123:1106.
11. DAVIS, J.G., MICCHI, E.P. and LINEWATER, H. 1961. Processing of poultry by products and their utilization

in feeds. I processing of poultry by products. U. S. Govt. Printing Office, Washington, D.C.

12. DELANEY, R.A.M. 1975. The nutritive value of porcine blood, plasma concentrates prepared by ultrafiltration and spray drying. J.Sci. Fd. Agric. 26:303.
13. DELANEY, R.A.M. DONNELLY, J.K. and BENDER, L.D. 1975. Concentration and characterization of porcine blood plasma. Lebensm-Wiss. und Tech. 1:20.
14. DILL, C.M. 1975. Use of blood protein in processed meat and sausage. The National Provisioner. 12:14.
15. EL-DASH, A.A. 1976. Objective experimental baking test using the farinograph and extensograph. 861 st. Annual Meeting. The American Association of Cereal Chemist, New Orleans.
16. F.A.O. 1974. Production year-book 1974. Production table number 110:111.
17. GATES, J.C. and KENNEDY, B.M. 1964. Fortification of flour and bread with milk solids and lysine. J. Amer. Dietist. Ass. 44:374.
18. GONZÁLEZ, M.M.A. 1973. Equilíbrio de aminoácidos essenciais no pão enriquecido com soja. Tese 46 apresentada à F.T.A. da UNICAMP para a obtenção do Título de Mestre.
19. GORDON, A. 1971. Animal blood as a source of protein in food products. Fd. Trade Review. 4:29.
20. HALLIDAY, D.A. 1973. Blood a source of protein. Proc. Bioch. 12:15.
21. HALLIDAY, D.A. 1975. Blood a source of protein. Proc. Bioch. 5:11.
22. HOOVER, W.J. 1974. New protein foods. Vol.1 A. Academic Press New York and London.
23. HUANG, P. 1964. Nutritive value of pig blood meal and the availability of lysine from its protein. J.Formosan

Med. Assoc, 63:1.

24. JACOB, H.E. 1974. Fd. Sc. and Tech. A series of monographs. Vol.1 A. Chap. IV (Altschul, M.A. ed.) Academic Press, New York.
25. KOBERT, R. 1915. Blood bread. Chem. Ztg. 39:69.
26. ROGER, Q.R. and HARPER, H.E. 1965. Amino acids diets and maximal growth in the rat. J. Nut. 87:267.
27. SANTA MARIA, J. 1969. Protein enriched. Cereal Foods for World Needs. (Dr. Max Milner, ed.) American Ass. Cereal Chem.
28. SATTERLEE, L.D., FREE, B. and LEVIN, E. 1973. Utilization of high protein tissue powders as a binder / extender in meat emulsions. J. of Fd. Sci. 38:306.
29. SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. and MOORE, S. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. 30:1190.
30. SPIES, J.R. 1967. Determination of triptophan in proteins. Anal. Chem. 39:12.
31. TAYBOR, P.T., DILL, C.W. and LANDMANN, W.A. 1975. Functional properties of proteins isolated from bovine blood by continious pilot process. J. of Fd. Sci. 1:155.
32. VILLEGAS, A.M., GONZÁLEZ, A. and CALDERÓN, R. 1968.. Microbiological and enzymatic evaluation of sesame protein. Cereal Chem. 5:379.
33. VRCHLABSKY, J. 1973. Stabilization of whole blood. Fd. Manufacture. 4:32.
34. WEBER, K. and OSBORN, M. 1969. The reliability of molecular weight determination by sodium sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244:440.

35. WRAY, W. and STUBBLEFIELD, E, 1970. A highly sensitive procedure for detection of histones in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 38:454.
36. WRIGLEY, C.W. 1968. Analytical fractionation of plant and animal protein by gel electrofocusing. *J. Chromatog.* 36:362.
37. YOUNG, C.R., LEWIS, R.W., LANDMANN, W.A. and DILL, C.W. 1973. Nutritive value of globin and plasma protein fractions from bovine blood. *Nutr. Rep. Intl.* 8:211.
38. YOUNG, R.H. and LAWRIE, R.A. 1974. Utilization of edible protein from meat industry by products and waste. Part.II. *J. of Fd. Tech.* 2:171.