

"CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E NUTRICIONAL DE
CONCENTRADO PROTÉICO DE FOLHAS DE MANDIOCA
(Manihot esculenta Crantz) OBTIDO POR ULTRA-
FILTRAÇÃO".

MOLINA

31/89

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

"CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E NUTRICIONAL DE
CONCENTRADO PROTÉICO DE FOLHAS DE MANDIOCA
(Manihot esculenta Crantz) OBTIDO POR UL-
TRAFILTRAÇÃO"

RUTILO CASTELLANOS MOLINA *in*
QUÍMICO BIÓLOGO

PROF. DR. ROBERTO H. MORETTI *in*
ORIENTADOR

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE
ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIA
DE ALIMENTOS.

Parcos

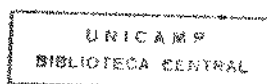
*Este exemplar corresponde a redação final da tese
defendida por Rutilo Castellanos Molina e aprovada
pelo Excmo. Julgador em 11/12.89.*

CAMPINAS

1989

Campinas, 11 de dezembro de 1989.

Roberto H. Moretti




BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Roberto Hermínio Moretti
(Orientador)

Suplente

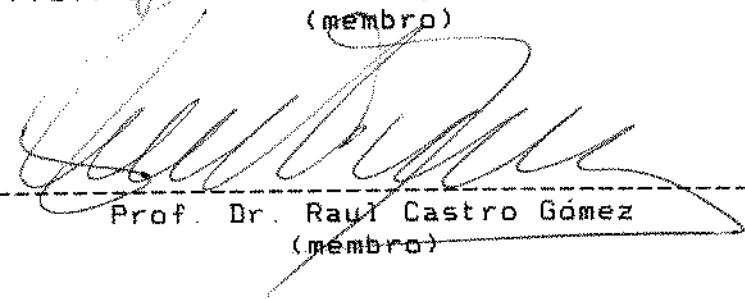
Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
(membro)



Prof. Dr. José Santo Goldoni
(membro)

José Luiz A. Fernandes

Prof. Dr. José Luiz Agapito Fernandes
(membro)



Prof. Dr. Raul Castro Gómez
(membro)

Salvador Massaguer Roig

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
(membro)

Suplente

Prof. Dr. José Luiz Vasconcelos Rocha
(membro)

Campinas, 11 de dezembro de 1989.

À meus pais:

Esther M. de Castellanos (In Memoriam)

Manuel Castellanos C.

À minha esposa Elsa

À minha filha Elsa Judith

À meus irmãos

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Roberto H. Moretti pela orientação recebida à realização desta tese.
- Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri pelo auxílio e colaboração recebida.
- Ao Dr. Hector Nara Jaimes, Director do "Centro de Investigación del I.P.N." pelas facilidades outorgadas.
- Ao Dr. Fernando Esparza García, Chefe do "Departamento de Biotecnologia del CINVESTAV - I.P.N" pelo apoio dado.
- Ao Prof. Ramón Hinojosa G. pelo apoio e pela amizade.
- Ao Prof. Dr. Horácio Pezoa G. pela colaboração e amizade.
- A Associação Brasileira de Indústrias de Alimentação - ABIA, pelas cópias deste trabalho.
- A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a conclusão deste trabalho.

íNDICE

PÁGINA

ÍNDICE GERAL.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xvi
I- INTRODUÇÃO.....	1
II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
II.1- Obtenção de proteínas foliares.....	8
II.2- Composição química.....	12
II.3- Fatores tóxicos.....	16
II.4- Fatores antinutritivos.....	18
II.5- Carotenóides.....	22
II.6- Saponinas.....	24

III.5- Métodos analíticos.....	50
III.5.1- Determinação de umidade.....	50
III.5.2- Determinação de cinzas.....	50
III.5.3- Determinação de gordura.....	51
III.5.4- Determinação de proteína bruta.....	51
III.5.5- Determinação de nitrogênio protéico.....	51
III.5.5.1- Determinação de nitrogênio não protéico.....	51
III.5.6- Determinação de fibra crua.....	52
III.5.7- Determinação de carboidratos.....	52
III.5.8- Determinação espectrofotométrica de proteínas.....	53
III.5.9- Determinação quantitativa de amino- ácidos.....	53
III.5.10- Determinação de carotenos totais...	54
III.5.11- Determinação de cianeto total e livre.....	54
III.5.12- Determinação de ácido fítico por cro- matografia líquida de alta pressão..	55
III.6- Determinações bioquímicas.....	56
III.6.1- Curva de solubilidade das proteínas foliares.....	56
III.6.2- Solubilidade das proteínas em função da força iônica.....	57
III.6.3- Eletroforese em gel de poliacrilamida - D.S.S.....	58
III.6.3.1- Metodologia eletroforética.....	58
III.6.3.2- Preparação das amostras.....	60
III.6.3.3- Preparação dos géis.....	61
III.6.3.4- Densitometria dos géis.....	62
III.6.4- Cromatografia em sephadex.....	63

III.6.5- Classificação das proteínas por solubilidade (classificação de Osborne).....	65
III.6.5.1- Albuminas.....	65
III.6.5.2- Globulinas.....	65
III.6.5.3- Prolaminas.....	66
III.6.5.4- Glutelinas.....	66
III.6.5.5- Escleroproteínas.....	66
III.7- Parâmetro nutricionais.....	67
III.7.1- Digestibilidade das proteínas "in vitro".....	67
III.7.2- Determinação do cômputo químico.....	68
III.7.3- Determinação de lisina disponível....	68
III.7.4- Determinação de triptofano.....	69
III.7.5- Determinação de quociente de eficiência proteica (PER).....	70
III.8- Determinação de propriedades funcionais.....	75
III.8.1- Capacidade de absorção de água.....	75
III.8.2- Capacidade de absorção de óleo.....	75
III.8.3- Capacidade de formação e estabilidade de espuma.....	76
III.8.4- Propriedades emulsificantes.....	77
III.8.4.1- Capacidade emulsificante.....	77
III.8.4.2- Atividade e estabilidade da emulsão.....	78
IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
IV.1- Composição das folhas de mandioca.....	80
IV.2- Solubilidade das proteínas de folhas de mandioca.....	82
IV.2.1- Efeito da força iônica na solubilidade das proteínas.....	85

IV.3- Concentração do extrato foliar por ultrafiltração.....	89
IV.4- Rendimentos dos concentrados protéicos foliares.....	97
IV.5- Estabilidade das proteínas durante a ultrafiltração.....	100
IV.6- Composição centesimal dos concentrados protéicos foliares.....	101
IV.7- Comportamento eletroforético.....	104
IV.8- Resolução cromatográfica em sephadex G-200.....	112
IV.9- Classificação das proteínas por solubilidade (Classificação de Osborne).....	118
IV.10- Conteúdo de aminoácidos.....	122
IV.11- Diminuição de cianetos nos concentrados protéicos foliares.....	125
IV.12- Estabilidade dos carotenos.....	130
IV.13- Digestibilidade das proteínas dos concentrados protéicos.....	133
IV.14- Níveis de lisina disponível.....	135
IV.15- Quociente de eficiência protéica (PER) dos concentrados protéicos foliares.....	137
IV.16- Germinação do gergelim.....	140
IV.16.1- Diminuição do conteúdo de fitatos.....	144
IV.17- Cômputo químico das proteínas.....	146

IV.18- Complementação de proteínas de folhas com proteínas de gergelim.....	149
IV.19- Propriedades funcionais dos concentrados proteícos foliares.....	153
IV.19.1- Absorção de água.....	153
IV.19.2- Absorção de gordura.....	155
IV.19.3- Capacidade espumante e estabilidade da espuma.....	158
IV.19.3.1- Estabilidade da espuma.....	159
IV.19.4- Propriedades emulsificantes.....	162
IV.19.5- Propriedades de solubilidade.....	164
V- CONCLUSÕES.....	168
VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	170

ÍNDICE DE TABELAS

	PÁGINA
I- Consumo e produção mundial de mandioca.....	6
II- Conteúdo de aminoácidos em folha de mandioca.....	13
III- Composição média dos concentrados protéicos foliares.....	14
IV- Conteúdos indicativos em polifenóis de proteínas foliares de alfafa.....	16
V- Compostos potencialmente tóxicos que podem existir nas preparações protéicas foliares.....	17
VI- Classificação das propriedades dos alimentos.....	33
VII- Composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos.....	72
VIII- Composição centesimal das mistura salina usada nas dietas para os ensaios biológicos.....	73
IX- Composição de mistura vitamínica utilizada nas dietas para os ensaios biológicos.....	74
X- Composição centesimal das folhas de mandioca.....	81
XI- Comportamento da diafiltração de extratos de folhas de mandioca e 25, 40 e 50°C.....	96
XII- Rendimento de concentrados protéico, porcentagem de proteína nos concentrados e porcentagem de proteína recuperada a partir das folhas de mandioca.....	99

XIII- Composição centesimal de concentrados protéicos foliares de mandioca obtidos por ultrafiltração.....	102
XIV- Composição centesimal de concentrado protéico foliar de mandioca obtido por termocoagulação.....	103
XV- Análise por solubilidade das proteínas dos concentrados protéicos de folhas de mandioca e das proteínas da folha liofilizada.....	121
XVI- Conteúdo de aminoácidos nos concentrados protéicos obtidos por ultrafiltração e por termocoagulação e padrão FAO/OMS (1973).....	123
XVII- Conteúdo de aminoácidos nas sementes de gergelim, farinha desengordura de gergelim germinado e padrão FAO/OMS (1973).....	124
XVIII- Conteúdo de cianeto livre, combinado e total em folhas de mandioca e em concentrados protéicos obtidos por ultrafiltração e por termocoagulação.....	129
XIX- Conteúdo de carotenos totais nas folhas de mandioca e concentrados protéicos (por ultrafiltração e por termocoagulação).....	132
XX- Digestibilidade das proteínas "in vitro" de concentrados protéicos foliares de mandioca.....	134
XXI- Disponibilidade de lisina em proteínas de folhas de mandioca e concentrados protéicos (por ultrafiltração e por termocoagulação).....	136
XXII- Quociente de eficiência protéica (PER) da caseína, farinha desengordurada de gergelim germinado, concentrados protéicos foliares e misturas.....	138
XXIII- Análise percentual de semente de gergelim (variedade "Instituto").....	142
XXIV- Análise percentual de gergelim germinado.....	142

XXV- Análise percentual de farinha desengordura de gergelim germinado e descascado.....	143
XXVI- Conteúdo de ácido fítico em semente de gergelim, gergelim descascado, gergelim germinado (96 h) gergelim germinado e descascado.....	145
XXVII- Capacidade formadora de espuma e estabilidade da espuma de concentrados protéicos foliares de mandioca obtidos por ultrafiltração e por termocoagulação) e concentrado protéico de soja.....	161
XXVIII- Atividade emulsificante, capacidade emulsificante, estabilidade da emulsão em função do pH em concentrados protéicos de folhas de mandioca obtidos por ultrafiltração e por termocoagulação e concentrado protéico de soja.....	163

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINAS
01- Processo de obtenção de concentrado protéico foliar de mandioca por termocoagulação ácida.....	43
02- Processo de obtenção de concentrado protéico foliar de mandioca por ultrafiltração.....	44
03- Homogeneizador "Eyli Dicon" utilizado para a extração de proteína foliar de mandioca.....	45
04- Detalhe do moinho homogeneizador "Elly Dicon".....	46
05- Equipamento piloto de ultrafiltração Alfa-Laval.....	47
06- Solubilidade do nitrogênio protéico e não protéico das folhas da mandioca em função do pH a 25°C....	83
07- Solubilidade do nitrogênio protéico e não protéico das folhas da mandioca em função do pH a 45°C....	84
08- Efeito de diferentes concentrações de metabissulfito de sódio na solubilidade das proteínas foliares de mandioca em função do pH a 25°C.....	88
09- Comportamento da ultrafiltração do extrato foliar de mandioca a 25°C.....	90
10- Comportamento da ultrafiltração do extrato foliar de mandioca a 40°C.....	93
11- Comportamento da ultrafiltração do extrato foliar de mandioca a 50°C.....	94

12- Eletroforese em gel de Poliacrilamida - D.S.S. de extrato de proteínas de folhas de mandioca durante a ultrafiltração a 50°C.....	106
13- Densitogramas de zonas eletroforéticas de proteínas do extrato foliar de mandioca durante a ultrafiltração a 50°C.....	107
14- Eletroforese em gel de Poliacrilamida - D.S.S. de concentrados protéicos de folhas de mandioca.....	108
15- Densitogramas de zonas eletroforéticas de proteínas de concentrados protéicos de folhas de mandioca.....	109
16- Eletroforese de em gel de Poliacrilamida - D.S.S. de concentrados protéicos liofilizados de folhas de mandioca.....	110
17- Densitogramas de zonas eletroforéticas de proteínas de concentrados protéicos liofilizados e do licor residual da termocoagulação.....	111
18- Cromatografia em coluna de Sephadex G-200 de proteínas solúveis em estado nativo das folhas de mandioca.....	115
19- Cromatografia em coluna de Sephadex G-200 de proteínas solúveis do concentrado protéico foliar de mandioca obtido por ultrafiltração.....	116
20- Cromatografia em coluna de Sephadex G-200 de proteínas solúveis do concentrado protéico foliar de mandioca obtido por termocoagulação ácida.....	117
21- Mudanças na concentração de HCN livre e combinado no extrato alcalino de proteínas das folhas de mandioca com respeito ao tempo.....	127
22- Cômputo químico das proteínas de misturas de concentrado protéico foliar de mandioca (por ultrafiltração) e gergelim.....	147

23- Cômputo químico das proteínas de misturas de concentrado protéico foliar de mandioca (por termocoagulação) e gergelim.....	148
24- Ganho de peso de ratos Wistar alimentados com caseína, concentrado protéico foliar de mandioca (ultrafiltração), farinha desengordurada de gergelim germinado e a misturas de ambos.....	150
25- Ganho de peso de ratos Wistar alimentados com caseína, concentrado protéico foliar de mandioca (termocoagulação), farinha desengordurada de gergelim germinado e a misturas de ambos.....	151
26- Capacidade de absorção de água de concentrado protéico foliar de mandioca obtido por ultrafiltração, por termocoagulação e de concentrado protéico de soja.....	154
27- Capacidade de absorção de óleo de concentrado protéico foliar de mandioca obtidos por ultrafiltração, por termocoagulação e concentrado protéico de soja.....	157
28- Curva de solubilidade das proteínas do concentrado de folhas de mandioca obtido por termocoagulação e por ultrafiltração.....	167

RESUMO

O presente trabalho visa caracterizar alguns parâmetros bioquímicos e nutricionais do concentrado protéico de folhas de mandioca (Manihot esculenta Crantz.) obtido por ultrafiltração, comparativamente com o concentrado protéico obtido por termocoagulação para provável uso na alimentação humana.

Ambos os concentrados protéicos foram obtidos a partir dos extratos aquosos das folhas finamente moídas na presença de metabissulfito de sódio a 2% e pH 9 e separação posterior do bagaço.

Para otimizar a extração das proteínas foliares foram analisadas as condições de temperatura, pH e concentrações do sal utilizado.

Foram efetuados testes de ultrafiltração do extrato alcalino das folhas a temperaturas de 25, 40 e 50°C sendo que coseguiu-se o menor tempo de operação a 50°C.

O concentrado protéico termocoagulado foi obtido submetendo o extrato aquoso foliar a pH 4 e após aquecimento a 85°C por injeção direta de vapor. Ambos os concentrados foram desidratados por "spray drying" nas mesmas condições e foram recuperados do concentrado obtido por ultrafiltração e do concentrado obtido por termocoagulação, 28 e 20% das proteínas contidas originalmente nas folhas, respectivamente.

Os estudos eletroforéticos em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio, em cromatografia em coluna de sephadex G-200 e a análise de solubilidade (Classificação de Osborne) dos concentrados protéicos estudados e de proteínas nativas, mostraram diferenças que sugerem mudanças nas proteínas causadas pelo processo de termocoagulação e em menor grau pelo processo de ultrafiltração.

Foram verificadas as mudanças nas concentrações de cianeto livre e combinado no extrato alcalino das folhas em função do tempo de processamento a 50°C. Foi também determinado o teor destes cianetos nas folhas frescas e nos concentrados protéicos estudados. O menor teor foi encontrado no concentrado obtido por ultrafiltração.

Os concentrados protéicos obtidos por ultrafiltração e termocoagulação não mostraram diferenças significativas na sua composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, porém encontraram-se valores mais altos de carotenos totais, lisina disponível, digestibilidade "in vitro" no concentrado obtido por ultrafiltração.

As determinações das propriedades funcionais nos concentrados protéicos estudados, mostraram para o concentrado obtido por ultrafiltração valores mais altos de capacidade de absorção de água e gordura, propriedades de solubilidade, propriedades espumantes e emulsificantes. A propriedade de absorção de gordura foi marcadamente superior no concentrado protéico obtido por termocoagulação.

A qualidade nutricional das proteínas de ambos os concentrados protéicos foram avaliadas pela determinação do valor PER. Para o concentrado obtido por ultrafiltração foi de 1,81 e para o obtido por termocoagulação foi de 1,60. Também foi determinado o valor de PER de misturas destes concentrados protéicos com farinha desengordurada de gergelim germinado em proporções baseadas nos índices químicos das suas proteínas. Conseguiu-se para a mistura do concentrado obtido por ultrafiltração e para o obtido por termocoagulação um valor de PER de 2,30 e 1,90, respectivamente, em relação a caseína 2,5.

SUMMARY

This work attempts to characterize the protein concentrate of manioc leaves, obtained by ultrafiltration, from a biochemical and nutritional point of view. It compares this product with that obtained by heat coagulation, having in mind its probable use as human food. Both protein concentrates were obtained from aqueous extracts of finely ground leaves with the aid of 2% sodium metabisulfite at pH 9 and subsequent separation from the bagasse.

In order to get the best extraction of leaf protein, working conditions of temperature, pH and salt concentration were evaluated. Ultrafiltration tests of leaf alkaline extract were made at 25, 40 and 50°C. Shortest operation time occurred at 50°C. The heat coagulated protein concentrate was obtained at pH 4 and 85°C by direct steam injection.

The two concentrates were dehydrated by spray drying under the same working conditions. The extraction yield of protein from the concentrate obtained by ultrafiltration was 28%; a 20% yield was obtained from the other concentrate when compared to the amount of protein original by present in the leaves.

Electrophoretic studies carried out in sodium polyacrylamide dodecyl sulfate gel, chromatography on a Sephadex G-200 column and solubility studies suggested that the protein concentrates and the original proteins were different what

suggested changes in the proteins caused by the heat coagulation process and to a lesser extent by the ultrafiltration process.

Changes in free and combined cyanide concentrations in the alkaline leaf extract as a function of processing time at 50°C were determined. The amounts of cyanide present in the green leaves and in the protein concentrates were also determined. The smallest quantity was present in the ultrafiltration concentrate.

The two concentrates did not show noticeable differences in their proximate percent composition and aminoacid contents. Nevertheless, higher values of total carotenes, lysine and digestibility in vitro were found in the ultrafiltered concentrate.

The determination of functional properties of the two protein concentrates showed higher values of water absorption capacity, solubility and foaming tendency in the ultrafiltered concentrate. On the other hand, fat absorption was noticeably superior in the heat coagulated concentrate.

The nutritional quality of the protein from both concentrates was evaluated by determining the PER value, which was 1.81 for the ultrafiltered concentrate and 1.60 for the heat coagulated concentrate. PER values of mixtures of both protein concentrate with defatted, germinated sesame flour were also determined, based on the chemical indices of their proteins. PER values of 2.30 and 1.90 in relation to casein 2.5 were obtained for the ultrafiltered and for the heat coagulated concentrates respectively.

I- INTRODUÇÃO

O inadequado suprimento de proteínas de boa qualidade nutritiva para fins de alimentação humana constitui um dos mais sérios problemas que atualmente enfrenta a humanidade, pelo que muitos dos esforços científicos e tecnológicos vão encaminhados à procura de novas fontes de proteínas para ajudar a resolver este problema de importância vital.

É certo que as proteínas de origem animal são de excelente qualidade nutritiva e organoléptica motivo pelo qual são muito apreciadas. A bioconversão a partir de proteínas vegetais é de baixo rendimento; se requerem de 2,7 a 17,7 kg de proteína vegetal para produzir 1 kg de proteína animal.

Por hectare, se pode obter cada ano, de 150 a 200 kg de proteína de carne, 400 kg de proteínas lácteas, 500 a 700 kg de proteínas de cereais, de 700 a 1200 kg de proteínas de oleaginosas, porém pode-se obter de 1800 a 3000 kg de proteínas foliares como as da alfafa.

As folhas verdes das plantas constituem potencialmente um bom aporte proteico; mas seu consumo direto está fortemente limitado por alguns fatores, tais como o alto conteúdo de fibra, presença de substâncias tóxicas, fatores antinutritivos e o sabor. No entanto, é possível fazer uso destas proteínas se o material foliar for submetido a processos tecnológicos apropriados que permitam eliminar consideravelmente os fatores limitantes mencionados.

De maneira geral, as proteínas foliares apresentam um bom perfil de aminoácidos ao serem comparadas com o padrão FAO/OMS (1973), com a característica de ter um alto conteúdo de lisina. No entanto, a maioria é deficitária em aminoácidos sulfurados.

As investigações sobre proteínas foliares começaram a realizar-se de forma sistemática desde o ano de 1942 com Pirie na Inglaterra, posteriormente com Bickoff, Kohler e Kinsella nos Estados Unidos, Hollo na Hungria, Giroud e Ferrando na França e Stahman no Canadá.

As investigações efetuadas têm conduzido ao desenvolvimento de processos que têm sido modificados, melhorados e adaptados às condições de cada país através dos anos. Atualmente se encontram instalados em várias partes do mundo alguns processos a nível comercial para obter concentrados proteicos foliares, entre eles figuram o processo PRO-XAN desenvolvido por "The Valley Dihydrating Co.", Sterling Co. na Califórnia, EUA. Estes produtos comerciais contêm 40% de proteínas, 300 mg de carotenos e 900 mg de xantofilas por quilograma de produto seco e são utilizados principalmente para rações de aves. O processo FRANZE-LUZERNE, estabelecido na França, produz o concentrado protéico foliar "P.X", "P.X. qualidade H" e isolado protéico foliar com conteúdos de proteínas de 46%, 65% e 90% respectivamente. Outros processos a nível industrial se encontram na Inglaterra (Processo VEPEX) assim como na Dinamarca e Nova Zelândia.

Os métodos mais utilizados para a obtenção de proteínas foliares estão baseados na extração alcalina das proteínas mediante o rompimento celular na presença de uma substância extratora; uma vez separado o material fibroso do extrato protéico as proteínas são obtidas mediante a precipitação isoelétrica num meio ácido ou por termocoagulação e mais usualmente pela combinação de ambos os procedimentos. O coágulo protéico obtido é separado do licor e seco posteriormente.

Um método relativamente novo para separar e purificar proteínas alimentícias é a ultrafiltração, por meio da qual é possível obter rendimentos maiores que a precipitação direta, com a vantagem de que a ultrafiltração permite eliminar seletivamente substâncias indesejáveis de menor peso molecular que as proteínas, como fenóis, açúcares, etc., ademais não requer adição de substâncias químicas nem a aplicação de temperaturas elevadas, podendo-se obter concentrados protéicos de boa qualidade nutritiva e que conservam algumas propriedades funcionais desejáveis. A desvantagem relativa é o tempo de processamento, que se for prolongado, pode causar reações indesejáveis e proteólise.

A Mandioca (Manihot esculenta Crantz), constitui um alimento fundamental para aproximadamente 800 milhões de pessoas de zonas tropicais em várias partes do mundo, sendo uma das principais fontes de calorias na alimentação habitual. Apesar de que o consumo de mandioca no México é muito baixa, o "Plan Nacional de Yuca" da Secretaria da Agricultura projeta estender

consideravelmente o seu cultivo a 300.000 hectares. Os estudos agronômicos efetuados na Estação Agrícola Experimental de Huimanguillo, Tabasco, Mex., revelam que a variedade PAN-MEX 51 é das mais promissoras pela sua adaptabilidade e rendimento.

Esta cultura tão extensa em países tropicais gera também enormes quantidades de material foliar que não se aproveita ou se utiliza muito pouco para fins alimentícios.

O presente trabalho tem por objetivo principal determinar algumas características bioquímicas e nutricionais de um concentrado protéico de folha de mandioca (variedade PAN-MEX 51), obtido por ultrafiltração, comparativamente com o obtido por termocoagulação ácida. Ambos concentrados foram obtidos do suco protéico extraído do material foliar, considerando seu uso potencial na alimentação humana. Com o propósito de incrementar os rendimentos considerou-se importante estudar algumas condições para extração das proteínas e determinar algumas condições de temperatura e tempo de processo para a concentração e purificação do extrato foliar por ultrafiltração.

Por outro lado considerou-se importante avaliar os efeitos da ultrafiltração comparativamente com a termocoagulação em meio ácido, e eventualmente, com a precipitação isoeletrica, sobre algumas características bioquímicas das proteínas utilizando-se filtração em gel, eletroforese e propriedades de solubilidade, bem como o efeito da ultrafiltração sobre a eliminação do cianeto livre e combinado presentes no extrato.

O presente trabalho consistiu também na determinação de algumas propriedades funcionais dos concentrados protéicos

obtidos por ultrafiltração e por termocoagulação e na avaliação de algumas propriedades nutritivas tais como: recuperação de carotenos totais, qualidade das proteínas em base a determinação do perfil de aminoácidos, digestibilidade, eficiência protéica e resposta nutritiva em mistura com outra proteína complementar.

Para a finalidade de complementação, utilizou-se farinha desengordurada de sementes de gergelim, germinadas previamente com o propósito de diminuir o seu conteúdo de fitatos.

II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A mandioca, arbusto da Família das Euforbiáceas originárias das regiões tropicais da América do Sul, provavelmente do Brasil, atualmente se encontra difundida em quase todas as regiões tropicais do mundo, entre os 30° de latitude norte e 30° de latitude sul, desde o nível do mar até aos 2000 m de altitude e que recebe uma precipitação pluviométrica anual de 200 - 2000 mm.

Segundo PHILLIPS (1984) a mandioca é um dos alimentos mais importantes para uns 800 milhões de habitantes dessas zonas, se cultiva em 80 países, sendo que 53% da produção mundial provém de quatro países: Brasil (21,32%), Indonésia (11,2%), Tailândia (10,7%) e Zaire (10,2%). Na Tabela I são apresentados os dados estimados do consumo e produção de mandioca a nível mundial para os anos de 1985 e 1990.

TABELA I - Consumo e produção de mandioca (em milhares de toneladas métricas).

Região	1985		1990	
	Consumo	Produção	Consumo	Produção
Mundial	78809	124987	88715	135513
África	44480	47311	51216	50081
América Latina	14103	27693	15212	25219
Sul da Ásia	8065	7503	8770	7950
Sudeste Asiático	9418	43211	10368	53820

Fonte: PHILLIPS (1984).

A sua ampla distribuição geográfica no mundo faz com que seja conhecida com diferentes nomes, segundo a região. Na América do Sul e América Central é conhecida como "mandioca", na África como "manioc", nas Antilhas como "tapioca", nos países de fala inglesa como "cassava" e no México como "yuca" ou "guacamote". O nome científico mais utilizado para designar esta planta é Manihot esculenta Crantz, mas existem outros nomes como M. dulcis, M. aipi, M. palmata, M. utilíssima, Jamphamanihot, Jatrofamanihot L. (RENVOIZE, 1972).

A mandioca é um cultivar de subsistência e constitui em países da África e de alguns da América Latina a segunda ou terceira das fontes mais importantes de calorias. O principal destino da produção da raiz de mandioca é para consumo humano, porém tem grandes aplicações como ingrediente em alimentos balanceados, produção de álcool e nas indústrias de adesivos.

A produção de folhas geradas neste cultivo é de grande magnitude. A quantidade de material foliar produzido pela planta é variável segundo a idade, variedade, técnicas de cultivo, condições do solo e climatológicas. Segundo TORRES (1980), uma média estimada de 1,62 kg de folhas é produzida por planta que rende 2,93 kg de raízes, o que nos dá uma idéia da produção de folha nas zonas onde se cultiva a mandioca.

II.1- Obtenção de proteínas foliares:

O método generalizado para a obtenção de proteínas de folhas está baseado na extração da proteína mediante a ação combinada do solvente e o rompimento celular. A parte fibrosa é separada do suco por métodos convencionais de centrifugação ou prensagem. O suco contendo as proteínas extraídas é tratado com vapor direto a diferentes temperaturas, de 60° a 85°C, para fracionar termicamente às proteínas. Também podem ser obtidas por precipitação isoeletrica e termocoagulação, para obter proteína total (não fracionada). Recentemente se tem estudado a utilização de polieletrólitos.

As proteínas obtidas podem ser desidratadas, aplicando diferentes métodos segundo a qualidade final do concentrado ou isolado protéico, que se deseja.

A extração das proteínas foliares dependerá em grande parte do grau da desintegração celular para liberar as proteínas contidas nos diferentes compartimentos celulares. Geralmente o rompimento celular se leva a cabo de 3 maneiras: por impacto, por corte e por aplicação de pressão diferencial, ou pela combinação destes princípios como são os equipamentos desenhados nos quais o material é forçado a passar por orifícios pequenos e ao mesmo tempo produz um gradiente de pressão em volta das células causando rompimento. (HUMPHRIES, 1982)

Outro equipamento proposto por PIRIE (1978) baseado numa prensa de parafuso, equipado de impulsores, os quais incrementam a fricção e concretamente a desintegração da folha.

No processo da desintegração celular se liberam conjuntamente com as proteínas outras substâncias de interesse bioquímico como o são os polifenóis que pela sua grande reatividade e em presença das polifenol-oxidases formam quinonas, que por sua vez reagem com as proteínas formando complexos insolúveis que diminuem significativamente a extractabilidade, além de que, pela combinação de polifenóis ocasiona a formação de taninos. (MONTIES, 1981).

DE FREMERY e col. (1972) assinalam que o licor e o coágulo protéico podem ser separados por filtração, centrifugação ou prensagem. O coágulo antes de ser prensado é lavado com água a pH 4,0 para remover alguns alcalóides e reduzir os níveis de compostos hidrosolúveis e nitrogênio não protéico.

Em estudos sobre proteínas foliares de alfafa, MORRISON e PIRIE (1961) consideram que coágulos protéicos podem ser prensados até obter um conteúdo de 40% de matéria seca e utilizados diretamente em alimentos, ou melhor, secá-los completamente.

A secagem com circulação de ar quente produz um enegrecimento intenso assim como também um marcado endurecimento do produto pela transformação da clorofila em feofitina e reacções de Maillard.

A secagem por liofilização dos coágulos protéicos foliares não tem as consequências do escurecimento e a consequente baixa do valor nutritivo, como demonstram os

trabalhos de MORRISON e PIRIE (1961), mas este procedimento não resultaria econômico.

Se tem estudado a extração da proteína foliar por meio de solventes orgânicos os quais removem a clorofila e outros lipídios. Segundo os estudos de BRAY e col. (1978) os solventes mais promissores para a extração em grande escala seria propa-2 ol e butan-1-ol com o qual obtem-se produtos sem a cor verde.

Segundo MORRISON e PIRIE (1961) e VALLE DEVI e col. (1965) a eliminação de lipídios dos coágulos protéicos com o uso de solventes polares melhora grandemente a estabilidade do produto.

DE FREMERY e col. (1972) e NAGY e col. (1978) em investigações sobre a extração das proteínas foliares durante o processo de obtenção, marcam a ação desfavorável de enzimas proteolíticas e lipoxidases presentes no suco protéico.

Outros métodos de separação das proteínas presentes no suco tem sido estudados por KNUCKLES e col. (1980b) usando flocculantes poliônicos, os quais permitem separar do suco protéico o material cloroplástico sem a aplicação de calor. Em outros trabalhos, como os de BRAY e HUMPHRIES (1979), se aplica o uso combinado de polieletrólitos com variações de pH. Neste processo recupera-se uma fração protéica altamente contaminada com o flocculante e outra fração de alta pureza.

Em outros estudos similares para separar as proteínas foliares BARANIAK e col. (1985) usando comparativamente um flocculante catiônico (Macrofloc LY-27) e um flocculante

catiônico (Giglar G-5) separaram a fração verde e a citoplasmática branca da alfafa.

HUMPRIES (1982) menciona um processo patenteado no qual se usa quitosano (poli-B-(1-4)-2-amino-2-desoxy-D- glicose) a pH 5,0 - 5,5 para flocular as proteínas cloroplásticas que posteriormente são separadas por métodos convencionais de filtração ou centrifugação. O floculante permanece na solução e pode ser recuperado por manipulação de pH 7,0. A proteína citoplasmática branca pode então ser obtida do líquido por precipitação, livre do floculante.

A ultrafiltração e a diafiltração são processos relativamente novos para a separação e concentração de proteínas de materiais alimentícios, que tem encontrado uso generalizado a níveis comerciais na obtenção de proteínas vegetais e proteínas de leite principalmente. O processo de ultrafiltração usa membranas poliméricas porosas e separa moléculas em base principalmente, ao seu peso molecular. As condições físicas e químicas para o processo são relativamente leves e a desnaturação das proteínas é de menor grau, LEWIS (1982).

Numerosos autores tem estudado a obtenção e purificação de proteínas vegetais. OKUBO e col. (1975) estudaram a dissolução de fitatos da proteína de soja e a remoção por ultrafiltração do fitato dissolvido.

OMOSAIYE e col. (1978) estudaram a remoção dos oligosacarídeos, OMOSAIYE e CHERYAN (1979) estudaram a remoção do fator antitriptico da soja. LAWHON e col. (1978) e LAWHON e col. (1979) estudaram comparativamente vários sistemas de

membranas e diferentes técnicas de extração para a obtenção de proteínas de soja.

KNUCKLES e col. (1980a), em escala de planta piloto estudaram a concentração e purificação das proteínas solúveis da alfafa por ultrafiltração e diafiltração, separando primeiramente a fração cloroplástica obtida por termocoagulação a 50°C.

OSTROWSKI-MEISSNER (1980) efetuou um estudo sobre a quantidade e qualidade das proteínas extraídas de folhas de gramas, usando comparativamente a precipitação por termocoagulação e a obtenção por ultrafiltração e encontrou diferenças significativas em relação a rendimentos, características químicas, biológicas e nutritivas dos concentrados protéicos foliares obtidos.

II.2- Composição química

A composição de aminoácidos das diferentes frações de proteínas foliares tem sido estudada por vários autores e, dentre eles, pode-se mencionar os efetuados por BYERS (1971a e 1971b) que faz uma revisão muito extensa com referência à composição em aminoácidos de preparações de proteínas foliares que compreendem as proteínas não fracionadas, as frações cloroplásticas e citoplasmáticas.

NAGY e col. (1978) fizeram um estudo comparativo do conteúdo de aminoácidos em várias plantas tropicais e reportaram

para a folha da mandioca a seguinte composição, segundo a Tabela II.

Tabela II - Conteúdo de aminoácidos em folha de mandioca (expressos em gramas de aminoácidos por cem gramas de proteína).

Lisina	6,7	Histidina	2,4
Fenilalanina	5,9	Tirosina	4,0
Metionina	1,6	Cistina	
Treonina	4,8	Ác. Aspártico	10,3
Leucina	9,9	Serina	4,2
Isoleucina	5,2	Ác. Glutâmico	13,0
Valina	6,6	Prolina	5,3
Triptofano		Glicina	5,8
Arginina	6,7	Alanina	7,5

Estudos de BYERS (1971a) e GERLOFF e col. (1965) concluem que as proteínas foliares contém um balanço de aminoácidos adequado o qual não varia consideravelmente entre as diferentes espécies nem tão pouco é afetado pela idade fisiológica e a fertilização das plantas. Porém, as diferenças na composição de aminoácidos nas frações cloroplástica e citoplasmática tem sido comprovadas nos trabalhos de BYERS (1971b), GERLOFF e col. (1965), CHIBNALL e col. (1963) e WILSON e TILLEY (1965).

Em outros estudos os limites do conteúdo de aminoácidos essenciais em várias espécies de plantas estão consignados por HUMPHRIES (1982) no qual se evidencia de maneira geral, que as proteínas não fracionadas são deficientes em aminoácidos sulfurados, mas não nas proteínas citoplasmáticas

obtidas por polieletrólitos, centrifugação e tratamento térmico diferencial, porém em todas as preparações apresentam-se conteúdos de lisina superiores ao recomendado pela FAO/OMS (1973).

HUMPHRIES (1982) expressa a composição média de concentrados protéicos foliares que se mostra na Tabela III.

TABELA III - Composição média dos concentrados protéicos foliares.

Componente	Concentrado total sem fracionar (%)	Concentrado extraído com solventes (%)	Fração citoplasmática (%)
Proteínas	50 - 65	65 - 85	70 - 95
Lipídios	13 - 30	2 - 5	0,5 - 5,0
Carboidratos	5 - 20	10 - 30	5 - 30
Cinzas	0,5 - 1,5	2 - 8	0,5 - 1,0
Fibras	0,5 - 1,5	0,5 - 1,5	-

Os lipídios contidos nos concentrados protéicos foliares têm sido objeto de interesse para muitos autores, HUDSON e KARIS (1973) que tem estudado a composição dos lipídios, verificaram que a concentração de ácidos graxos insaturados é alta.

HUDSON e KARIS (1976) e ARCKOL (1973), relacionaram a instabilidade das proteínas foliares durante a estocagem com a quantidade de ácidos graxos presentes.

DOUILLARD (1981) em estudos sobre lipídios foliares descreve os lipídios cuticulares em parafinas, esterres, alcoóis primários e secundários, cetonas, aldeídos e ácidos graxos livres e os lipídios intracelulares em ácidos graxos, glicerídeos, glicerolipídios, pigmentos, esteróis e quinonas lipossolúveis.

Os compostos polifenólicos presentes nas folhas tem despertado muito interesse pelas propriedades antinutricionais. Estes compostos constituem um grupo de substâncias de grande reatividade química devido ao fato de possuírem grupos hidróxilos, agrupamentos fenólicos ou quinônicos, bem como a presença de anéis aromáticos hidrófobos, os quais podem formar interações específicas como por exemplo com o grupo epsilon-amino da lisina e diminuir desta forma a disponibilidade deste aminoácido essencial.

Os polifenóis também são responsáveis pela aparição de cores e sabores dominantes (DOUILLARD, 1985).

Além da presença de polifenóis nas proteínas foliares tem sido constatada a presença de flavonosídeos e coumestrol. DOUILLARD (1985) menciona os seguintes dados que são apresentados na Tabela IV.

TABELA IV - Conteúdos indicativos em polifenóis de proteínas foliares de alfafa (base seca).

Preparação	Natureza do Polifenol	Conteúdo (%)
Proteína Branca Lavada com Metanol	Ácido Clorogênico	1,4
Proteína Verde	Flavonosídeos	2,0
Proteína Branca não lavada	Polifenóis solúveis coumestrol	0,43 87ppm
Proteína Branca lavada com álcool e água	Polifenóis solúveis coumestrol	0,14 20ppm
Fonte: DOUILLARD (1985).		

II.3- Fatores tóxicos

MONTIES (1981) manifesta a importância dos fatores antinutritivos e tóxicos presentes nos vegetais e considera que as rotas metabólicas secundárias nos vegetais permitem a biosíntese de famílias de substâncias como os alcalóides, os polifenóis ou as saponinas. Estas famílias de substâncias são caracterizadas por conter esqueletos de carbono os quais possuem substitutos com funções alcoólicas, fenólicas ou carboidratos e podem formar glicosídeos.

Na Tabela V se apresenta uma relação de compostos potencialmente tóxicos que podem existir nas preparações protéicas foliares.

TABELA V - Compostos potencialmente tóxicos que podem existir nas preparações protéicas foliares.

I- COMPOSTOS DIVERSOS:

Derivados de pigmentos clorofilados
Ácidos nucleicos (bases purínicas)
Minerais (cinzas, metais pesados)
Alcalóides
Produtos de degradação de lipídios

II- PROTEÍNAS:

Inibidores de proteases
Lectinas
Agentes espumantes

III- GLICOSÍDEOS:

Glicosídeos diversos (cianogênicos, bocigênicos)
Agentes de Favismo, Flatulência
Saponinas
Polifenóis

Fonte: MONTIES (1981)

Em estudos com ratos brancos têm-se detectado que alguns concentrados protéicos foliares (fração verde) podem ocasionar dermatite e fotosensibilização pela presença de produtos de degradação das clorofilas (feoforbidas e filoeritrinas). MONTIES (1981) menciona a correlação que existe entre a atividade da clorofila com o modo de preparação das proteínas verdes e os efeitos de fotosensibilização por proteínas verdes de folhas de beterraba, alfafa, assim como por extratos clorofílicos de folhas de espinafre.

A presença de ácidos nucleicos tem sido estudada por diferentes autores entre eles CLIFFORD e col. (1977) que encontraram conteúdos da ordem de 1% de ácidos nucleicos em alfafa seca e de 0,1% a 0,01% nas proteínas verdes e brancas respectivamente. O baixo conteúdo de ácidos nucleicos nas proteínas brancas (citoplásmicas) se atribui ao fato de que as nucleoproteínas são coprecipitadas com as proteínas verdes.

Em relação à presença de minerais na preparação de proteínas foliares PIRIE (1978) discute a importância da presença e da acumulação, no vegetal, de metais pesados, como o chumbo.

A presença de alcalóides nas folhas poderia constituir um problema de toxicidade, porém não constitui risco considerável nos isolados e concentrados protéicos foliares, dado que os alcalóides solúveis em ácido não precipitam depois da extração e poderiam ser eliminados pelas lavagens (PIRIE, 1978).

II.4- Fatores antinutritivos

Numerosos autores tem estudado a presença de proteínas com atividade biológica, particularmente as que possuem atividade enzimática de hidrólise e de oxidação: DOUILLARD (1985), CHANG e col. (1978), ERIKSSON (1982), FINLEY e col. (1980), GROSSMAN e col. (1974), JOHAL e col. (1980), TOZZI e col. (1981), WHEELER e FINLEY (1981).

Os inibidores de proteases (tripsina e quimotripsina) constituem um grupo muito importante de fatores antinutritivos. A presença de inibidores de proteases foram assinaladas primeiramente nas forragens de alfafa e de trevo, posteriormente foram constatadas em alfafa desidratada por RAMIRES e MICHEL (1960). Estes autores lograram isolar de alfafa desidratada um inibidor de tripsina solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos como o álcool etílico a 95%.

A presença de proteases nos concentrados e isolados protéicos foliares pode ser minimizada durante o processo de obtenção, devido a que as proteases são degradadas pelo calor e além disso eliminadas pela sua solubilidade em água (MONTIES, 1981).

Outro grupo de substâncias com propriedades antinutritivas é constituído pelas lectinas que são proteínas de alto peso molecular capazes de formar complexos com numerosos compostos de origem vegetal, microbiano ou animal. As lectinas podem ser altamente tóxicas e são as responsáveis pelo baixo valor biológico das proteínas vegetais não cozidas (MONTIES, 1981).

As lectinas atuam também a nível da superfície intestinal em certas células epiteliais perturbando assim a absorção de nutrientes. Em ensaios "in vitro" sobre intestino de rato, tem se colocado em evidência uma diminuição de 50% de absorção da glicose em presença de lectinas de feijão. No

entanto, os riscos de toxicidade destas substâncias podem ser minimizadas com os tratamentos térmicos comuns, os quais desnaturam as lectinas (MONTIES, 1981).

A degradação de glicerolipídios é rápida nos tecidos vegetais desorganizados e danificados e as lipases de maior atividade nas folhas são as acil hidrolases e as fosfolipases (DOUILLARD, 1981). As acil hidrolases reagem com glicerolipídios liberando ácidos graxos, sendo que estas enzimas encontram-se em forma solúvel ligadas às lamelas dos cloroplastos.

A fosforilase D transforma os fosfolipídios em ácido fosfatídico e podem catalisar a reação de transfosfatização. As lipases presentes nas folhas podem desorganizar as membranas lipoproteicas e liberar grupos ácidos susceptíveis de oxidação tais como a α -oxidação, β -oxidação, ω -oxidação, hidroxilação e peroxidação. Isto pode originar a formação de radicais livres e as espécies químicas formadas possuem uma grande reatividade química em particular com sistemas insaturados (vitaminas, pigmentos) e com alguns resíduos de aminoácidos (DOUILLARD, 1981).

A interação das proteínas com lipídios oxidados durante o curso da peroxidação tem sido estudada intensivamente pela repercussão nutritiva que este tipo de reação tem sobre as proteínas alimentícias.

Outro efeito antinutritivo pode ser causado pela peroxidação dos lipídios em alimentos protéicos mal acondicionados, os quais podem ocasionar alterações no sabor, gosto e valor nutritivo. A nível molecular, estes efeitos se

originam pela formação de complexos não covalentes entre polifenóis e lipídios, assim como pela modificação química resultante das reações entre hidroperóxidos dos ácidos graxos e as proteínas. A atividade da lipoxigenase tem um papel importante nestes efeitos de acordo com GARDENER (1979), DOUILLARD (1981).

MARION e DOUILLARD (1985) fazem uma revisão sobre esta interação e mencionam a degradação da cisteína em presença de ácidos graxos peroxidados, assim como a degradação do triptofano livre pelos hidroperóxidos de ácido linoléico e a degradação da histidina.

A oxidação da metionina a sulfoxido de metionina tem sido estudada por KAREL e col. (1975), estes mesmos autores estudaram a degradação da lisina em presença de hidroperóxidos de ácidos graxos.

MARION e DOUILLARD (1985) baseados em trabalhos de outros autores mencionam que as proteínas em presença de lipídios oxidados podem ser polimerizadas, este tipo de reação se leva a cabo mediante a ação de um intermediário, o aldeído malônico, que é produzido pela degradação de ácidos graxos polinsaturados.

As reações de cisão das proteínas pela presença dos lipídios oxidados se explica pela transferência de um radical livre do lipídio ao carbono alfa dos aminoácidos, posteriormente se produz a formação do hidroperóxido correspondente e a cisão da cadeia, de maneira similar como ocorre com os ácidos graxos polinsaturados (MARION e DOUILLARD, 1985).

II.5- Carotenóides

As reações dos ácidos graxos oxidados com pigmentos e quinonas tem sido revisadas por diferentes autores. PIRIE (1971) menciona a diminuição dos carotenos durante a secagem da alfafa devido a oxidação pelos lipídios oxidados. DOUILLARD (1981) menciona que os β -carotenos podem sofrer três tipos de reações em presença de linoleato de etilo oxidado, estas reações são: a formação de isômeros, oxidação e ruptura da cadeia.

Algumas moléculas derivadas dos hidroperóxidos depois da ruptura da cadeia de carbono podem dar origem a compostos com estruturas diversas de acordo com HATANAKA e col. (1978), MARION e DOUILLARD (1985), KALBRENER e col. (1976). Nas folhas, as reações deste tipo conduzem a formação de compostos responsáveis por aromas característicos, entre os quais se mencionam N-hexanal como constituinte do aroma de erva verde, cis-3-hexanol e trans-2-hexanol como constituinte de odor a folhas, N-pentil furano e etil-vinil-cetona relacionada ao aroma do feijão branco e feijão branco verde em vagem (DOUILLARD, 1981).

SAUVANT (1981) assinala a importância dos carotenóides nos produtos foliares para a alimentação animal e reporta os conteúdos de xantofilas em diversas matérias primas, assim como também a eficiência da utilização dos pigmentos carotenóides para aves poedeiras.

A eficiência da utilização de xantofilas para a coloração da carne de frango e para a coloração do ovo empregando alfafa desidratada, concentrado protéico obtido pelo processo PRO-XAN e luteína, tem sido estudada por KUZMICKY e col. (1977) os quais apresentam um índice crescente de intensidade de cor na ordem citada.

Os diferentes tratamentos tecnológicos no processamento de proteínas foliares influem sobre a estabilidade dos carotenóides. Diversos autores têm estudado a estabilidade dos pigmentos durante o processamento das proteínas foliares. LIVINGSTON e col. (1980), MITCHELL e HUAGE (1946), ERICKSSON (1982) estudaram a degradação dos carotenos por mecanismo enzimático oxidante.

As operações que se utilizam durante o processo de obtenção de concentrados protéicos foliares como o são a moagem, prensagem e a utilização de pH ácido determinam uma diminuição considerável da estabilidade dos carotenos (ARKCOLL e HOLDEN, 1973).

LYON e KOHLER (1982) estudaram as condições de baixa umidade, refrigeração, obscuridade, atmosfera inerte e presença de antioxidantes para melhorar a estabilidade dos carotenóides em concentrados protéicos de alfafa durante a estocagem.

II.6- Saponinas

A presença de saponinas nas folhas verdes de alfafa e os efeitos negativos sobre o crescimento em frangos foi revisado por PETERSON (1950). Os estudos de RESHEF e col. (1976) demonstram que a toxidez das saponinas de alfafa está relacionada com a presença de ácido medicagênico presente nas frações de saponinas precipitadas por colesterol.

Sob o ponto de vista quantitativo encontram-se diferenças no conteúdo de saponinas das plantas segundo a variedade no caso da alfafa como o demonstram os estudos de HEGSTED e LINKSWILLER (1980), DOUILLARD e MARION (1987).

MONTIES (1981) consigna conteúdos de saponinas de 1,71% e 0,14% em dois tipos de cultivares de alfafa Ranger, em base seca, e consigna também os valores de saponinas contidas nas proteínas não fracionadas, nas proteínas verdes e nas proteínas brancas preparadas a partir destas duas variedades de alfafa e encontram maior concentração de saponinas nas proteínas brancas (citoplásmicas) em relação às outras proteínas, concluindo assim que existe a formação de um complexo proteína-saponina.

Outros autores opinam que durante a obtenção da proteína foliar as saponinas se encontram na fração cloroplástica (LIVINGSTONE e col., 1979).

A importância da presença das saponinas nos alimentos têm sido revista extensivamente por vários autores.

CHEEKE (1976) analisa os efeitos que se atribuem às saponinas em relação a que provocam meteorismo pelas suas propriedades tensoativas que induzem a formação de espuma, sobre a relação da mobilidade dos músculos lisos, sobre sua ação hemolítica dos eritrócitos, em relação à inibição da atividade de algumas enzimas: colinesterase, tripsina e quimotripsina, sobre o sabor dos alimentos e os seus efeitos negativos no crescimento de animais monogástricos.

Os trabalhos de RESHEF e col. (1976) confirmam que as saponinas podem ligar-se ao colesterol e interferirem no metabolismo de lipídios. Alguns autores como LAGUNA e col. mencionado por HUMPHRIES (1982) têm sugerido a adição de saponinas para combater as doenças cardiovasculares onde está implicando o colesterol. De acordo com este mesmo autor esta adição de saponinas poderia ser sob a forma de proteína foliar de alfafa, mas considera a necessidade de estudos exaustivos para ver os efeitos de altos níveis de saponinas na dieta humana e as consequências para as pessoas com desordens intestinais.

II.7- Glicosídeos

Os vegetais são capazes de sintetizar os mais numerosos glicosídeos e a toxidez intrínseca destes glicosídeos

dependerá, em geral, das propriedades físico-químicas do seu aglicon, polifenol ou saponina.

Por outra parte o efeito antinutritivo poderá depender do caráter glicosídico que determina a solubilidade e as uniões eventuais, covalentes ou não, com as preparações protéicas (MONTIES, 1981).

Entre os glicosídeos mais frequentes que se têm encontrado nas folhas verdes das plantas se podem mencionar os glicosídeos cianogênicos, glicosídeos bocigênicos e agentes do favismo, cujos efeitos têm sido revisados por LIENER (1979).

II.7.1- Glicosídeos cianogênicos

A importância do conhecimento profundo e exaustivo em tudo que concerne à mandioca e aos seus produtos, fica manifestado ao se considerar que esta planta constitui um alimento fundamental para 800 milhões de pessoas em todo o mundo (PHILLIPS, 1984).

O conteúdo do ácido cianídrico na planta de mandioca varia consideravelmente de uma espécie para outra devido principalmente a fatores genéticos, ecológicos e fisiológicos.

A fertilização do solo com nitrogênio e potássio influem consideravelmente na concentração de glicosídeos cianogênicos na planta. Conforme reportado por DE BRUJIN (1984) o adubo nitrogenado aumenta a concentração dos aminoácidos valina e isoleucina na planta, estes aminoácidos são os

precursores dos glicosídeos cianogênicos, porém o adubo com potássio diminui a concentração destes aminoácidos.

YEOH e CHEW (1974) citado por MOJARRO (1981) consideram que a formação dos glicosídeos cianogênicos na planta de mandioca efetua-se a partir dos aminoácidos livres: valina e isoleucina.

A planta de mandioca contém enzimas que hidrolisam os glicosídeos cianogênicos, entre elas figuram a linamarase, rhodanase, glicosidase e hidroxinitriloliase que ao hidrolisar os glicosídeos liberam ácido cianídrico e outros compostos tais como acetona, metiletilcetona e glicose (COON, 1973).

DE BRUJIN (1971) citado por DE BRUJIN (1982) tem estudado a distribuição da atividade da linamarase em diferentes partes da planta e em diversas variedades e encontrou diferenças entre uma variedade e outra, bem como valores muito altos nas folhas e na casca da raiz e valores muito baixos nas raízes descascadas.

LOREZI e col. (1978) fazem menção que ao podar a parte aérea da planta antes da colheita o conteúdo de ácido cianídrico nas raízes se reduz de 67 para 35 mg por kg em 14 dias, sendo a diminuição mais notória nos primeiros 3 dias.

ERMANS e col. (1984) em estudos clínicos efetuados na África Central concluem que o consumo de mandioca unido à deficiência de iodo é um fator chave na etiologia do bócio endêmico e do cretinismo. Neste estudo manifesta-se que o tiocianeto é o fator bocigênico diretamente envolvido e que as

anormalidades da função tireoidal observadas, estão relacionadas diretamente com a proporção entre tiocianeto e iodo.

A mandioca constitui um dos principais alimentos em países tropicais do terceiro mundo e portanto torna-se muito importante a necessidade de reduzir ao máximo a toxidez dos alimentos à base de mandioca.

A mandioca e seus produtos, dos quais não se tem extraído o tóxico adequadamente, podem conter ácido cianídrico que ao ser ingerido pelo ser humano se combina com grupos SH proporcionados provavelmente pela metionina mediante a ação da enzima rhodanase para produzir tiocianetos os quais são eliminados pela urina (COON, 1973).

A linamarina é hidrolisada primeiramente em glicose e cianidrina que por sua vez se decompõe em acetona e ácido cianídrico, pelo que o cianeto na mandioca pode apresentar-se como ácido cianídrico livre ou cianeto combinado (glicosídeo ou cianidrina). (OKE, 1969).

MEUSER e SMOLNIK (1979) citado por OKE (1984) estudaram diferentes técnicas de secagem com relação a eliminação do cianeto num produto fermentado de mandioca conhecido com o nome de "gari" e observaram que a desidratação por congelação ou a desidratação rápida somente permitiram eliminar o cianeto livre que representa 50% do cianeto total. Quando se aplicou a secagem por rolos ou em tambor da pasta fresca com um pH de 5,5 - 5,8 pode-se eliminar quase todo o cianeto, mas quando este método de secagem se aplicou à pasta fermentada (pH 3,8) o conteúdo de cianeto residual aumentou como

consequência de que o baixo pH favorece a reação para a esquerda (reação N° 1). (página 126).

ADEWUSI (1981) citado por OKE (1984) menciona que quando se ingere mandioca ou seus produtos que contém glicosídeos residuais e não há β -glicosidase, o glicosídeo não é metabolizado e a maior parte é eliminada pela urina principalmente e muito pouco pelas fezes.

Quando se ingere o glicosídeo conjuntamente com os componentes das folhas ou outros ingredientes da mandioca que contenham β -glicosidase ou linamarase é hidrolisado e se libera o ácido cianídrico.

O processamento da mandioca para o consumo humano tem um papel muito importante na eliminação dos tóxicos. Na maioria dos métodos tradicionais, a ruptura das células libera a enzima linamarase e os glicosídeos cianogênicos que pelo contato reagem formando o ácido cianídrico que se libera mediante a volatilização ou dissolução em água. Alguns métodos tradicionais utilizam a fermentação como método para hidrolisar os glicosídeos (COOKE, 1984).

MONTGOMERY (1969) assinala a dificuldade de se conhecer com exatidão a toxidez relativa do cianeto livre (não glicosídico) e do combinado (glicosídios cianogênicos).

II.8- Aspectos Nutricionais

SINGH (1971) menciona os resultados obtidos em estudos de reabilitação de crianças mal nutridas, usando dietas contendo leite como única fonte de proteínas e dietas com a metade do leite substituída por proteínas foliares. Os resultados mostraram que ingestões usuais de nitrogênio (500 mg/kg/dia), produziram uma retenção de nitrogênio igual em ambas dietas, enquanto que para ingestões foram maiores (770 mg/kg/dia), a retenção de nitrogênio foi maior com a dieta a base de leite exclusivamente como fonte de proteína (WATERLOW, 1962).

SINGH (1971) reportou resultados de melhoramento da qualidade de uma dieta baixa em proteínas com a adição de proteína foliar crua e cozida, em estudos metabólicos com crianças de 10-12 anos de idade.

DORAISWAMY e col. (1969) efetuaram um interessante estudo sobre nutrição de longa duração (6 meses) com crianças de 6 - 11 anos, usando dietas complementadas com proteína foliar ou lisina. As respostas nutritivas com relação a altura, peso, estado geral de nutrição, retenção do nitrogênio foram superiores a das dietas habituais.

HUMPHRIES (1982) faz referência a um importante estudo efetuado na Índia por MARTIN, no qual num período de 2 anos (1975-1977) comparou-se a suplementação da dieta habitual com concentrado protéico de alfafa e outras três proteínas comerciais: "horse-gran", "cereal-pulse" e leite desnatado, em

prova efetuada com 250 crianças de 2 anos e meio a 5 anos de idade. Ao terminar o estudo, o estado geral de nutrição de todas as crianças foi satisfatório. As crianças que receberam a suplementação com concentrado protéico de alfafa, tiveram uma resposta de crescimento igual ou melhor às que receberam os outros suplementos, à exceção dos do leite desnatado. Destaca-se o fato de que as crianças que receberam concentrado protéico de alfafa, apresentaram um grande incremento de retinol no soro, melhor que qualquer outro grupo.

HUMPHRIES (1982) assinala que neste estudo não houve efeitos adversos, nem problemas de aceitação por parte dos consumidores de concentrado protéico foliar.

DEVADAS e VIJAYALAKSHMI (1985) reportaram os resultados obtidos em outros estudos efetuados na Índia durante três anos, com crianças de idade pré-escolar para avaliar o uso da proteína foliar de alfafa como alimento humano. O estado nutricional foi avaliado através de medidas antropométricas, exames clínicos, estimativas bioquímicas e supervisão dietética e concluíram que a proteína foliar, é capaz de promover o crescimento satisfatoriamente.

KAMALANATHAN e col. (1985) reportaram resultados positivos no desenvolvimento de um programa educacional de nutrição, para popularizar o uso de proteína foliar em quatro vilas na Índia e com a participação de 614 famílias.

OSTROWSKI-WESSNER (1985) discutiram os fatores sócio-culturais num programa de suplementação nutritiva com proteína foliar de alfafa, efetuado em Saltillo, Coahuila, México.

CARLSSON e HANCZAKOWSKI (1985) estudaram o valor nutritivo de concentrados protéicos foliares de quinoa e alfafa despigmentados com iso-propanol em misturas com glúten de trigo, farinha de soja, farinha de carne, farinha de peixe, leite desnatado e soro de leite em pó. O melhor efeito suplementar do concentrado protéico, foi quando se utilizou em misturas com cereal e com leite, como demonstram os resultados obtidos de Valor Biológico, Digestibilidade verdadeira e NPU.

Outras possíveis fontes de proteína foliar tem sido estudadas em relação ao valor nutritivo e composição bioquímica: folha da amoreira (Morus alba) por SRIVASTAVA e MOHAN (1985), mostarda (Brassica napus) e couve (Brassica olearacea) por CHAKRABARTI (1985).

II.9- Propriedades Funcionais

Um dos aspectos mais importantes na investigação das proteínas é o conhecimento das propriedades funcionais, já que estas determinam o campo de aplicação quando as proteínas são usadas como ingredientes nos alimentos (HERMANSSON, 1979).

Alguns autores como KINSELLA (1976), KINSELLA (1981), JOHSON (1970), WOLF (1970), ACTON e col. (1983), BREKKE e EISELL (1981), DENCH e col. (1981) têm relacionado o conceito de propriedade funcional com as características físico-químicas mais relevantes das proteínas, as quais influem notoriamente nos processamentos de elaboração de alimentos. Este conceito enquadra as proteínas em relação a sua função utilitária para indústria.

SHEN (1981) definiu as propriedades funcionais como uma manifestação das propriedades físico-químicas das proteínas sob certas condições, o que representa o comportamento das proteínas num sistema alimentício em que está presente.

POUR-EL (1981) apresentou uma classificação das propriedades de um alimento segundo a Tabela VI.

TABELA VI - Classificação das propriedades dos alimentos.

1- NUTRITIVAS:

- 1.1. Nutritivas propriamente ditas
- 1.2. Fatores de toxidez, antinutritivos

2- FUNCIONAIS:

- 2.1. De tipo enzimático
- 2.2. Não enzimático
 - 2.2.1. Que afetam os sentidos
 - 2.2.2. Que afetam o seu manejo

Segundo HUMPHRIES (1982) as propriedades funcionais podem ser divididas em oito classes: organolépticas, cinestésicas, hidratação, reológicas, tensão superficial, estruturais, texturização e outras.

A solubilidade de uma proteína é uma característica funcional muito crítica para seu uso como ingrediente num alimento.

A solubilidade dos concentrados e isolados protéicos foliares podem variar conforme o método de obtenção, BETSCHART (1974), BETSCHART e KINSELLA (1974).

Os métodos mais comuns de precipitar as proteínas implica injeção direta de vapor o que produz um concentrado protéico praticamente insolúvel em toda a escala de pH (HUMPHRIES, 1982).

Quando se usa a precipitação ácida se obtém concentrados protéicos insolúveis na região do ponto isoelétrico, mas se incrementa em valores fora desta região (BETSCHART, 1974).

Alguns autores como MILLER e col. (1975) têm obtido proteína foliar citoplásmica solúvel, quando se evita durante o processo a desnaturação das proteínas, utilizando a precipitação ácida a pH 3,5 e 2°C de temperatura.

A modificação química dos concentrados protéicos foliares mediante a acetilação ou succinilação têm melhorado notoriamente a solubilidade (FRANZEN e KINSELLA, 1976).

Em estudos realizados sobre concentrados protéicos de folha de mandioca obtidos por ação combinada da precipitação

ácida e termocoagulação, TORRES (1980) encontrou a mínima solubilidade das proteínas a valores de pH de 2 a 4 e a máxima a valores de pH superiores a 8.

Em relação à propriedade funcional de absorver água, os concentrados e isolados protéicos de folhas apresentam elevada capacidade como o têm demonstrado os trabalhos de WANG e KINSELLA (1976a) e RIVAS BURGOS (1985).

HUMPHRIES (1982) explica que esta propriedade funcional de absorver água pode variar de acordo com o método de obtenção e conclui que os tratamentos com solventes orgânicos para extrair ou fracionar as proteínas, resultam num decréscimo da capacidade de absorver água.

TORRES (1980) encontrou para o concentrado protéico de folha de mandioca obtida por precipitação ácida e termocoagulação, uma capacidade de absorção de água semelhante à que apresenta o concentrado protéico de soja e bastante superior à da farinha de soja.

SANCHES LIMON (1987) encontrou que a capacidade de absorver água dos concentrados protéicos de folhas de chaya (Cnidoscolus chayamansa) e alfafa (Medicago sativa) desidratados por liofilização, apresentam uma capacidade de absorção de água 3 a 4 vezes superior aqueles que são secos por solventes orgânicos a 70°C.

Outra propriedade funcional que apresentam os concentrados protéicos foliares é sua excelente capacidade de absorver gordura que resulta ser superior aos que apresentam os isolados e concentrados de soja, como o demonstram os trabalhos

realizados por diferentes autores: WANG e KINSELLA (1976a), TORRES (1980), RIVAS BURGOS (1985), LIN e col. (1974) e HUMPHRIES (1982). No entanto esta propriedade pode ser diminuída quando se utiliza acetona para a extração das proteínas de acordo com WANG e KINSELLA (1976a).

TORRES (1980) encontrou para o concentrado protéico de folha de mandioca uma capacidade de absorção de gordura muito superior a que apresentou o concentrado e isolado de soja.

Tem-se detectado que os concentrados e isolados protéicos foliares apresentam boa capacidade de formar espuma, mas a estabilidade da espuma formada é reduzida. As propriedades de espumabilidade podem variar de acordo com o pH em que se efetue a medição (HUMPHRIES (1982), WANG e KINSELLA (1976b); assim também pode influir o método de obtenção dos produtos (BUCKINGHAN, 1970).

SANCHEZ LIMON (1987) encontrou valores insignificantes de capacidade espumante e estabilidade da espuma num estudo comparativo com diferentes métodos de secagem de concentrado protéico de alfafa e chaya. Estas mesmas propriedades se manifestaram quase nulas quando foram determinadas a valores de pH 2 a 12 no concentrado protéico de folha de mandioca obtido por termocoagulação (TORRES, 1980).

HUMPHRIES (1982) indica que em geral as proteínas foliares em forma de concentrado não fracionadas possuem boas propriedades emulsificantes, especialmente na faixa do ponto isoelétrico. No entanto, as emulsões formadas resultam ser instáveis.

SHEEN (1985) obteve um isolado protéico de alta pureza a partir de folhas de tabaco, mediante precipitação isoelétrica e secagem posterior por aspersão ou liofilização e encontrou propriedades de emulsificação e gelatinização similares as que apresenta o isolado de soja e a clara de ovo.

III- MATERIAL E MÉTODOS

III.1- Matérias primas

- Folha de mandioca: A folha de mandioca usada no presente trabalho foi da variedade PAN-MEX 51 cultivada na Estação Agrícola Experimental de Huimanguillo, Tabasco, México.

- Sementes de gergelim: Foi usada semente certificada da variedade INSTITUTO, procedente de Apatzingan, Michoacan, México, adquirida na "Productora Nacional de Semillas".

III.2- Reagentes

Para o desenvolvimento do trabalho foram usados reagentes de grau analítico, marcas Merck, J.T. Becker, Sigma, Eastman Kodak. Nas determinações eletroforéticas usaram-se reagentes de grau eletroforético e, para a avaliação nutritiva foram usados reagentes da marca Tekland Test Diets.

III.3- Aparelhos e equipamentos

III.3.1- Aparelhos

Foram utilizados os seguintes aparelhos: Sistema de digestão, destilação e titulação KYELTEC IV - TECATOR; balança analítica Sauter; espectrofotômetro Gilford, mod. 250; espectrofotômetro Perkin Elmer, mod. Lambda 3; balança para pesar animais Ohaus, mod. 700; centrífuga Damon IEC, mod. CU 5000; aparelho para eletroforese Bio-Rad; coluna de cromatografia de Farmácia Química; coletor de frações, marca LKB, mod. Instr. Group 7000; bomba peristáltica B. Binkmann, mod. STA 131900; Cromatógrafo de líquidos TRACOR, mod. 970A, equipado com detetor de U.V. 254 nm, coluna nucleosil C18, integrador Hewlett Packard 3290A; estufa a vácuo Thelco, mod. 19; estufa de incubação M. Ortiz; liquidificador Waring Blender, misturador Braun Multipratic; potenciômetro Beckman, mod. 4500; placas de agitação e aquecimento Thermolyne, mod. 1000 e material de vidro de uso comum no laboratório.

III.3.2- Equipamentos

Homogeneizador de 200 l Eily Dicon; centrífuga de cesto Tamez; equipamento piloto de ultrafiltração Alfa-Laval, mod. UFS-1 e cartucho Romicon HF-15-43 PM-30; secador por aspersão Niro Atomizer, mod. Minor; liofilizador New Brunswick, mod. B-66; moinho de martelos Weder Borss & White Metal Works; tacho de 200 l com camisa de aquecimento e resfriamento; extrator de gorduras tipo Soxhlet com capacidade de 500 g; prensa hidráulica de laboratório Carver; gaiolas individuais de aço inoxidável para ratos, marca Armexa.

III.4- Métodos experimentais

III.4.1- Obtenção de concentrado protéico das folhas de mandioca

As folhas de mandioca foram selecionadas, eliminando-se impurezas e material estranho, se efetuaram as pesagens convenientes segundo o tamanho do lote e posteriormente se lavaram com água potável corrente. As folhas limpas foram postas em banho numa solução de metabissulfito de sódio a 2% numa relação de 1:5 (p/v) durante uma hora.

As folhas foram moídas usando o mesmo líquido de maceração e ajustado o pH a 9 com solução de hidróxido de sódio.

Para lotes de 1 kg de folhas se usou para a extração um liquidificador Waring Blender de alta velocidade e para lotes de 20 kg, usou-se o homogeneizador Eily Dicon (figuras 3 e 4). O homogeneizado resultante com pH 8 foi centrifugado 2 vezes numa centrífuga de cestos, usando uma tela filtrante de algodão - nilon para reter o bagaço, o qual posteriormente foi lavado com 10 l de água.

O extrato de proteínas foi ajustado a um volume de 120 l e foi dividido em duas partes de 60 l cada uma.

III.4.1.1- Obtenção de concentrado protéico por termocoagulação

Sessenta (60) litros foram acidificados com solução de HCl agitando constantemente durante a adição do ácido até obter um pH de 3,5, condição na qual as proteínas encontram-se precipitadas, em continuação se injetou diretamente vapor até alcançar uma temperatura de 85°C, a qual se manteve durante 5 minutos. Deixou-se resfriar o produto coagulado e eliminou-se a fase aquosa por decantação e depois por filtração sobre papel de filtro. O coágulo protéico foi lavado com água até a neutralidade.

O coágulo úmido foi resuspendido em água e seco posteriormente por aspersão num secador Niro Atomizer, utilizando temperatura de entrada de ar de 225°C e saída de ar de 115°C. Durante a operação a suspensão do coágulo protéico se

manteve em agitação constante para impedir alguma obstrução do aparelho.

O produto seco obtido, de aspecto leve e de cor verde clara, foi envasado hermeticamente e guardado em refrigeração para estudos posteriores. Este processo ilustra-se na Figura 1.

III.4.1.2- Obtenção de concentrado protéico por ultrafiltração

Sessenta (60) litros de extrato protéico (pH 8) foram submetidos a ultrafiltração e a diafiltração no equipamento piloto Alfa-Laval (figura 5), manteve-se o extrato às temperaturas de prova (25, 40 e 50°C). O fator de concentração foi de 7.5 (volume final de 8 l) e a pressão de entrada controlada a 2 kg/cm². Durante o processo de ultrafiltração se tomaram alíquotas do "retido" e do "permeado" para determinar sólidos solúveis e nitrogênio total.

A solução concentrada (retida) foi diluída com 54 l de água num tanque de recirculação e após mantida a temperaturas de prova (25, 40 e 50°C), se concentrou no ultrafiltro novamente até 6 l. O retido com pH de 7,2 foi posteriormente seco por aspersão nas mesmas condições descritas anteriormente no item III.4.1. Este processo ilustra-se na Figura 2.

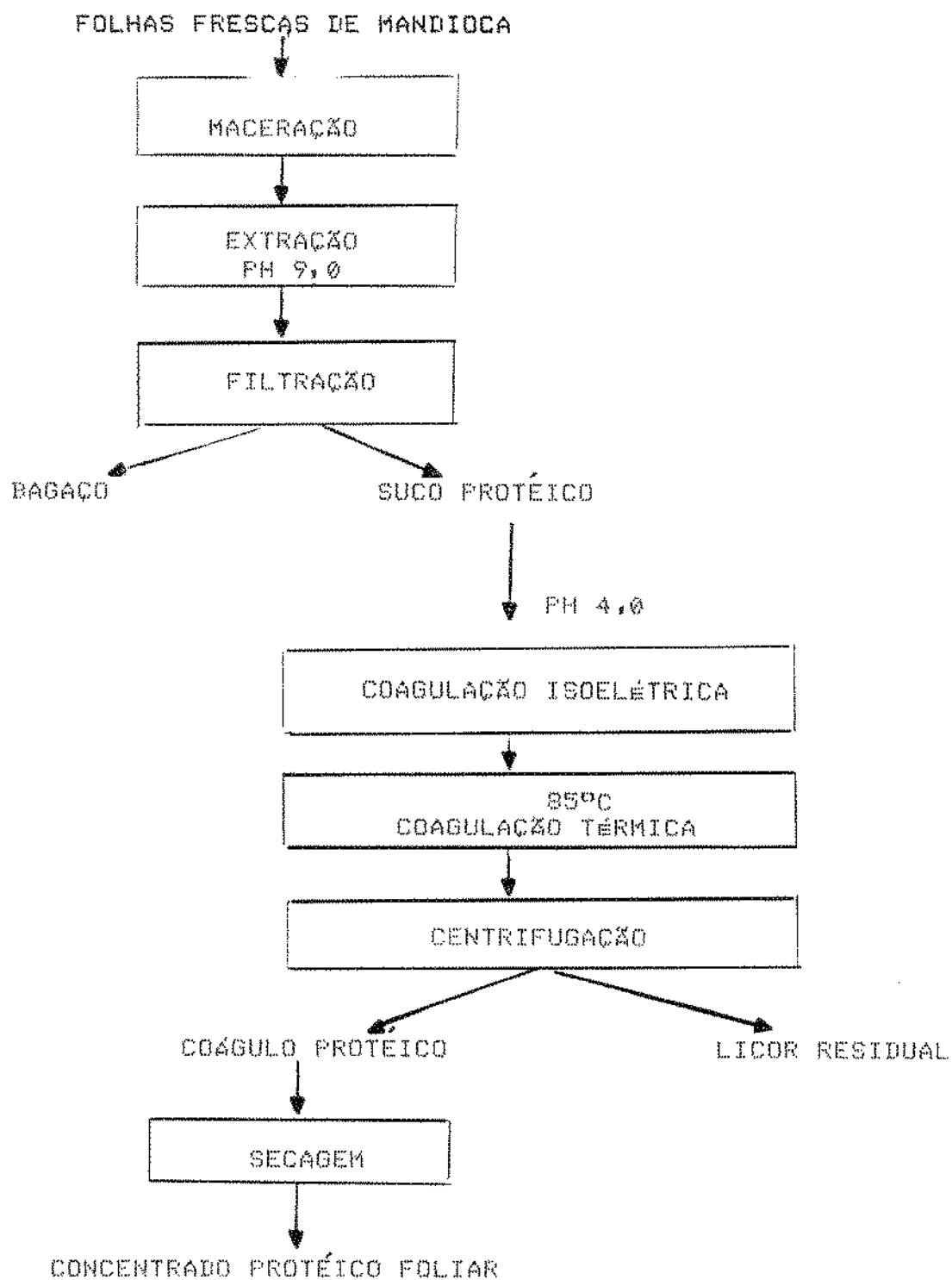


Figura 1 - Processo de obtenção de concentrado protéico foliar de mandioca por termocoagulação ácida.

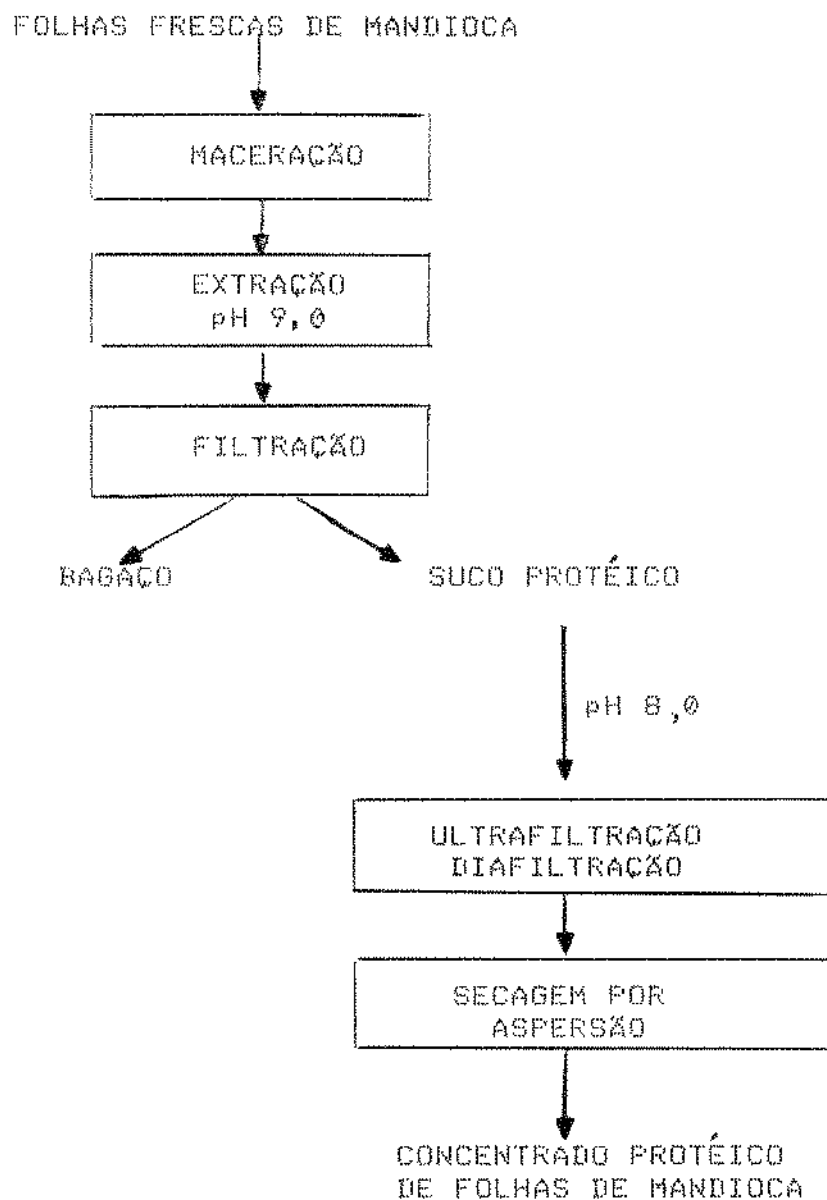


Figura 2 - Processo de obtenção de concentrado protéico de folha de mandioca por ultrafiltração.



Figura 3 - Homogeneizador "Eily-Dicon" utilizado para a extração de proteína foliar de mandioca.



Figura 4 - Detalhe do moinho homogeneizador "Elly Dicon".



Figura 5 - Equipamento piloto de ultrafiltração Alfa-Laval, modelo U.F.S.-1.

III.4.1.3- Obtenção de concentrado protéico isoelétrico

Foi obtido segundo o processamento descrito no item III.4.1. e III.4.1.1. O coágulo protéico formado pela ação do ácido sem aquecimento a 85°C foi filtrado em papel de filtro e lavado com água destilada até neutralidade e seco posteriormente por liofilização.

III.4.2- Preparação de farinha desengordurada de gergelim germinado

III.4.2.1- Germinação das sementes de gergelim

Um quilograma de sementes de gergelim foram lavadas suficientemente macerando-as abundantemente em água durante 1 hora, removendo-as ocasionalmente e eliminando as partículas flutuantes; posteriormente foram lavadas em água corrente e deixou-se escorrer. Em seguida as sementes foram submersas num banho de 5 l de álcool:água (30:70) por um tempo de 60 segundos, lavando-as posteriormente com bastante água.

Uma vez escorridas as sementes foram submersas durante 20 minutos num banho de 5 l de solução de hipoclorito de sódio a 1,5% contendo 5 ml de TWEEN 20, agitando ocasionalmente.

As sementes foram lavadas suficientemente em água e colocadas em camadas finas entre algodões e papel de filtro umedecidos com água. Deixou-se germinar a 25°C em ausência de luz e retiraram-se amostras a intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas, para análises posteriores.

III.4.2.2- Descascamento das sementes de gergelim germinadas

As sementes germinadas por 96 horas foram suspensas em 10 l de uma solução de bicarbonato de sódio a 3% com agitação constante durante 15 minutos. Posteriormente esfregaram-se manualmente as sementes para desprender a casca, deixou-se escorrer e em seguida as sementes foram colocadas numa solução de NaCl a 12%. Foram agitadas moderadamente durante 5 minutos; as cascas separaram-se das sementes por flutuação e foram facilmente eliminadas coletando-as na superfície do líquido.

III.4.2.3- Preparação da farinha desengordurada

As sementes descascadas foram lavadas abundantemente em água corrente e secas posteriormente a 60°C em estufa com circulação de ar. Uma vez secas procedeu-se a extração do óleo, primeiramente por meio de uma prensa hidráulica de laboratório, sendo que a pasta residual resultante foi submetida a extração

do óleo num extrator tipo Soxhlet usando éter de petróleo como solvente.

Uma vez extraído o óleo, foi eliminado o solvente da pasta residual em estufa com circulação de ar quente a 60°C. A pasta seca e livre de solvente foi moída finamente em moinho de martelos com malha 60 mesh.

III.5- Métodos analíticos

III.5.1- Determinação de umidade

A determinação de umidade foi efetuada segundo o método 44.31 da AACC de 1976.

III.5.2- Determinação de cinzas

Foi determinado o conteúdo de cinzas utilizando o método 08-16 descrito na AACC (1976).

III.5.3- Determinação de gordura

Para determinação de gordura foi utilizado o método 7.062 descrito na AOAC (1984) usando éter de petróleo como solvente durante 6 horas de extração.

III.5.4- Determinação de proteína bruta

Foi determinado o conteúdo de nitrogênio total pelo método de micro kjeldahl Nº 7.025 descrito na AOAC (1984). O conteúdo de nitrogênio foi multiplicado pelo fator 6,25 para obter o conteúdo de proteína bruta.

III.5.5- Determinação de nitrogênio protéico

Foi determinado pela diferença de nitrogênio total da amostra menos o nitrogênio não protéico.

III.5.5.1- Nitrogênio não protéico:

Foi determinado segundo o método de BECKER e col. (1940), no qual o nitrogênio protéico é precipitado com ácido tricloroacético 10% e o nitrogênio não protéico determinado no sobrenadante pelo método da AOAC (1984), após repouso e filtração.

III.5.6- Determinação de fibra crúa

Foi determinado o conteúdo de fibra bruta seguindo a metodologia de VAN DE KAMER e VAN GINKEL (1952) que, basicamente, consiste em digerir 2 g da amostra finamente moída e seca com 2 g de ácido tricloro acético, 5 ml de ácido nítrico e 70 ml de solução aquosa de ácido acético a 70% com refluxo durante 30 minutos. A mistura da reação filtra-se com ajuda de vácuo através de um funil de fundo de vidro poroso, posto previamente a peso constante.

No resíduo sólido seco se determina cinzas com a finalidade de correção dos cálculos.

Cálculo:

$$\% \text{ de fibra bruta} = \frac{\text{peso da amostra} - \text{peso do resíduo}}{\text{peso da amostra}} \times 100$$

III.5.7- Determinação de carboidratos

Os carboidratos foram determinados por diferença da soma das determinações anteriores em porcentagem.

III.5.8- Determinação espectrofotométrica de proteínas

As determinações de proteínas solúveis foram efetuadas seguindo a técnica descrita por GROVES e col. (1968) que, basicamente, consiste na determinação de absorbância a 224 nm e 233 nm da amostra dissolvida com tampão de fosfatos 0,1M a pH 7. A diferença entre a leitura obtida a 224 nm menos a leitura obtida a 233 nm se relacionou a uma curva de referência de albumina analisada nas mesmas condições.

III.5.9- Determinação quantitativa de aminoácidos

Para esta determinação foi utilizado um autoanalisador de aminoácidos Beckman, mod. 118 CL. Para a análise, as amostras foram submetidas ao seguinte tratamento: o material finamente moído e desengordurado foi submetido a hidrólise ácida durante 24 horas a 110°C com ácido clorídrico - 6N colocadas em ampolas fechadas sob vácuo. Transcorrido o período de hidrólise, o hidrolisado foi colocado num dessecador durante 48 horas com aplicação de vácuo a fim de secar e eliminar todo o ácido residual. O hidrolisado seco foi dissolvido em 1 ml de tampão de citrato com pH 3,25 e filtrado. Do filtrado tomaram-se 100 μ l para serem injetados no autoanalisador.

III.5.10- Determinação de carotenos totais

Para esta determinação procedeu-se segundo os delineamentos do método por separação em coluna de óxido de magnésio e celite descrito na A.O.A.C., método Nº 43.014 (1984).

III.5.11- Determinação de cianeto total e livre

Para estas determinações foi seguido o método descrito por LUCAS e SOTELO (1984) que, basicamente, consiste em colocar uma amostra do material a ser analisado com cerca de 5 a 60 mg de cianetos em tubos de vidro de 25x2 cm. Adicionou-se 5 ml de solução de β -glicosidase com ativador (250 mg de β -glicosidase Sigma Co., 1,7 g de NaNO_3 em 250 ml de tampão de fosfatos com pH 7).

Os tubos são então tampados com tampa de borracha dos quais, pendem para o interior do tubo, uma tira de papel de filtro Whatman Nº 2 de 10x2 cm impregnada com solução de picrato de sódio, preparada a partir de 2,5 g de picrato de sódio e 12,5 g de carbonato de sódio em 500 ml de água destilada. Os tubos são colocados a 40°C com agitação suave num banho metabólico durante 4 horas. Terminado o período de incubação, os tubos são colocados no congelador durante 30 minutos, ao cabo dos quais adicionou-se 1 ml de HCl 0,5N. Os tubos são tampados novamente, agitados manualmente com moderação para não

contaminar o papel com a solução e são colocados numa estufa a 60°C durante 30 minutos.

Depois deste tempo, a tira de papel impregnada com o produto colorido desenvolvido (isopurpurina) é retirada e se extrai o corante com 20 ml de água destilada exatamente medida num tubo de ensaio durante 3 minutos. A solução colorida é lida no espectrofotômetro a 510 nm com um branco preparado nas mesmas condições mas sem amostra.

As leituras foram relacionadas com as da curva padrão preparada segundo a técnica anteriormente descrita, usando soluções de cianeto de sódio em concentrações crescentes de 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/ml.

Para a determinação de cianeto livre, procedeu-se de igual maneira que no método descrito, a exceção de que não se faz a incubação com β -glicosidase.

O valor de cianeto combinado é obtido por diferença do valor do cianeto total menos o do cianeto livre.

III.5.12- Determinação de ácido fítico por cromatografia líquida de alta pressão

As determinações de ácido fítico foram efetuadas segundo o método de TANGENDJAJA e col. (1980), no qual 1 g de semente de gergelim finamente moída foi tratada com 25 ml de ácido tricloroacético 3% com agitação mecânica por 30 minutos a 25°C. Depois de centrifugação durante 20 minutos a 40,000 x g, o

sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore ($0,22 \mu\text{m}$), uma alíquota de $25 \mu\text{l}$ foi injetada no cromatógrafo e eluída com solução de acetato de sódio $0,005\text{M}$ com um fluxo de $0,8 \text{ ml/minuto}$.

O teor de ácido fítico nas amostras foi calculado pela relação da área do pico correspondente no cromatograma, com uma curva padrão elaborada com concentrações conhecidas de ácido fítico (10 a $100 \mu\text{g}/25 \mu\text{l}$) versus a área dos picos.

III.6- Determinações bioquímicas

III.6.1- Curva de solubilidade das proteínas foliares

Para esta determinação seguiram-se os delineamentos descritos por BETSCHART e KINSELLA (1973). Amostras de 1 g de farinha de folhas de mandioca secas por liofilização foram suspensas em 15 ml de água destilada, ajustando o pH a diferentes valores compreendidos na faixa de 2 a 12 com solução de $\text{NaOH } 0,5\text{N}$ ou $\text{HCl } 0,5\text{N}$ e aferidos posteriormente a um volume de 20 ml . As suspensões foram agitadas durante 30 minutos a 25°C e 50°C e centrifugadas a $10.000 \times g$ durante 10 minutos. Do líquido sobrenadante se tomaram alíquotas de $2,5 \text{ ml}$ para a determinação de nitrogênio total pelo método de micro Kjeldahl,

assim como também alíquotas de 5 ml para a determinação de nitrogênio protéico, segundo item III.5.5.

O índice de nitrogênio solúvel (NSI) a diferentes valores de pH foi calculado pela relação:

$$\% \text{NSI} = \frac{\text{nitrogênio solúvel da amostra}}{\text{nitrogênio total da amostra}} \times 100$$

A porcentagem de nitrogênio protéico solúvel foi calculado conforme a relação:

$$\% \text{ Nitrogênio protéico solúvel} = \frac{\text{Nitrogênio protéico solúvel da amostra}}{\text{Nitrogênio total da amostra}} \times 100$$

III.6.2- Solubilidade das proteínas em função da força iônica

Esta determinação foi efetuada seguindo basicamente o item III.6.1. com a diferença que nesta ocasião foi utilizada 20 g de folhas frescas (76,5 % de umidade) as quais foram moídas finamente num liquidificador "Waring Blendor" com 200 ml de solução de metabissulfito de sódio a concentrações de 0,1M, 0,2M, 0,3M e 0,4M, acionando o liquidificador 3 vezes durante 30 segundos com intervalos de 30 segundos cada vez.

A suspensão foi filtrada primeiramente em tecido de algodão para eliminar o bagaço grosso, após foi filtrado em

papel de filtro para eliminar as partículas finas. O filtrado foi aferido a 250 ml e foram tomadas alíquotas de 10 ml para a determinação de nitrogênio total.

III.6.3- Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (D.S.S.)

III.6.3.1- Metodologia eletroforética

A técnica seguida no presente trabalho para as determinações eletroforéticas em géis de poliacrilamida - DSS, baseou-se no método descrito por REID e BIELESKY (1968) e por WILLIAM STUDIER (1973) para o qual o seguinte procedimento foi adotado: montou-se a câmara eletroforética (Bio-Rad Laboratories) com as precauções necessárias para evitar fugas de gel.

O "pente" foi colocado entre as 2 placas de vidro e marcou-se na placa uma linha de um centímetro de distância do extremo inferior do pente; assim mesmo marcaram-se os extremos inferiores dos dentes do pente. Uma vez feitas as marcas, o pente foi retirado.

Com a ajuda de uma pipeta colocou-se o gel separador escorrendo-o pelas paredes da placa de vidro, procurando evitar a formação de bolhas até alcançar a linha marcada, cuja altura foi de 8,5 cm desde a base da câmara.

Deixou-se polimerizar a temperatura ambiente por 20 minutos. Quando se observou irregularidades na superfície do gel

durante a polimerização, adicionou-se com ajuda de uma pipeta Pasteur, 2 ml de uma solução de DSS a 3% para exercer uma pequena pressão sobre a superfície do gel e eliminar as irregularidades.

Uma vez polimerizado o gel, foi eliminada a solução de DSS e secou-se perfeitamente com papel de filtro as paredes interiores da placa de vidro. Procedeu-se a colocação do pente para encher o resto da câmara com o gel concentrador com ajuda de uma pipeta, até alcançar a altura da parte superior do pente evitando a formação de bolhas as quais foram eliminadas inclinando-se cuidadosamente a câmara.

O gel concentrador foi polimerizado à temperatura ambiente por 20 minutos e o pente retirado posteriormente com muito cuidado, procurando manter a integridade dos moldes do gel.

O gel foi lavado cuidadosamente com solução tampão da câmara eliminando-o posteriormente. Uma vez terminada a montagem do gel na câmara interna, esta foi colocada dentro da câmara externa a qual continha 1 l de solução tampão da câmara. Os moldes do gel concentrador foram cheios com tampão da câmara assim como também foram adicionados 300 ml deste tampão a parte superior da câmara.

Procedeu-se a colocação nos moldes respectivos, quantidades exatas das amostras com ajuda de seringas. Posteriormente foram ligados aos eletrodos e iniciou-se a corrida com uma corrente inicial de 20 mA durante uma hora e posteriormente a corrente foi ajustada a 40 mA até o término da

corrida, que foi quando a frente do corante indicador chegou a uma distância de 5 mm da base inferior do gel separador.

Uma vez desligada a câmara eletroforética, o gel foi retirado das placas de vidro cuidadosamente e colocado num banho com moderada agitação constante contendo a "solução corante" (azul brilhante de Coomassie a 0,15%) em metanol:ácido acético:água (5:1:5) o que permitiu que se efetuasse simultaneamente coloração e a fixação das proteínas.

Transcorrido este tempo, o excesso de corante, foi eliminado por banhos sucessivos do gel numa solução de metanol:ácido acético:água (3:1:6). Os géis foram conservados, para posteriores determinações densitométricas, em bolsas de polietileno contendo uma solução de ácido acético a 5%.

III.6.3.2- Preparação das amostras

Para as determinações eletroforéticas as amostras líquidas e sólidas foram tratadas com a "solução tampão da amostra" preparada segundo o indicado e submetida a um banho-maria a ebulição durante um minuto.

Em todos os tratamentos das amostras utilizou-se uma solução de proteína em solução tampão contendo $100\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ e em cada corrida colocou-se junto com as amostras uma referência de pironina e noutro molde mistura de marcadores: Miosina (cadeia pesada), P.M. 200.000; Fosforilase B, P.M. 97.400; Albumina sérica de bovino, P.M. 68.000; Albumina de ovo, P.M. 43.000; - quimotripsinogênio, P.M. 25.000; β -lactoglobulina, P.M. 18.400 e Citocromo C, P.M. 14.300.

III.6.3.3- Preparação dos géis

Para a preparação dos géis usaram-se os reativos nas proporções que a seguir são indicadas:

Reagentes	Gel separador (ml)	Gel concentrador (ml)
Acrilamida 30% - bis- acrilamida 0.8%	11,0	1
+ Tris 2M, pH 8.8	6,0	---
Tris 2M, pH 6.8	----	0,65
Dodecil sulfato de sódio a 10%	0,3	0,1
++Temed (0.1 ml/0.9 ml de água)	0,3	0,1
Persulfato de amônio a 1%	0,5	1,05
Água deionizada	11,90	7,10
+ Tris = Hidroxil metil aminometano		
++Temed = N,N,N',N'tetrametileno etilendiamina		

A mistura é degaseificada durante um minuto antes da adição de Temed.

Solução tampão para a amostra

Foi preparada com 5 ml de glicerol; 2,5 ml de 2 mercaptoetanol; 15 ml de DSS a 10%; 6,25 ml de solução tampão de tris, acertado a 50 ml com água desionizada.

Solução tampão de tris foi preparada dissolvendo 6,6 g de Tris; 4 ml de DSS a 10% e aferido a 100 ml com água ajustado previamente a pH 6,8 com HCl 0.1N.

Solução tampão para a câmara

Foi preparada com 250 ml de tampão Tris glicina, 10 ml de DSS a 10% levados a um volume de 1 l com água desionizada.

A solução tampão de Tris glicina foi preparada dissolvendo 12 g de Tris, 57,6 g de glicina e aferido a um litro com água desionizada.

A solução corante foi preparada com azul brilhante de Coomassie em metanol:ácido acético:água (5:1:5) calculado para dar concentração de 0,15%.

O descolorante utilizado foi uma solução de ácido acético e metanol, em água desionizada a 10% e 30%, respectivamente.

III.6.3.4- Densitometria dos géis

A absorção de cada uma das bandas dos géis foi determinada utilizando-se um espectrofotômetro Gilford 250, equipado com os acessórios apropriados para as determinações densitométricas. As leituras foram efetuadas a 570 nm.

III.6.4- Cromatografia em sephadex

Para a filtração em gel foi utilizado sephadex G-200 previamente tratado com água destilada a 121°C, 15 Lbs de pressão durante 1 hora com a finalidade de entumecer as partículas. Posteriormente eliminou-se as partículas muito finas mediante lavagens sucessivas e decantação. Finalmente o sephadex foi degaseificado aplicando vácuo durante 4 horas, até que não foi observado despreendimento de bolhas.

Foi utilizada uma coluna de vidro (Farmácia Química) de 60 cm de altura e 2,2 cm de diâmetro interno, na qual foi enchida com sephadex com todas as precauções necessárias para manter a integridade e homogeneidade da coluna.

A água contida na coluna foi então substituída por solução tampão Tris glicina 0,1N, pH 8,8, fazendo passar esta solução através da coluna a uma velocidade de 3 gotas por minuto. A altura final do gel foi de 58 cm. O volume vazio da coluna foi determinado aplicando 250 μ l de solução de azul dextran (P.M. 2.000.000) a 0,2% e eluindo-se com solução tampão de Tris glicina pH 8,8 a uma velocidade de 3 gotas por minuto, coletando-se frações de 2 ml.

As frações contidas nos tubos foram lidas a 280 nm no espectrofotômetro Gilford, obtendo-se a máxima leitura no volume correspondente a 76 ml o qual é considerado como o volume vazio.

Para a calibração da coluna usaram-se os seguintes marcadores: Gama-globulina humana, P.M. 150.000; Albumina sérica de bovino, P.M. 66.000; Citocromo C, P.M. 12.400 os quais foram aplicados a coluna dissolvidos no tampão de Tris glicina (500 μ g de cada marcador em 500 μ l de tampão) e misturados posteriormente.

As amostras a serem estudadas foram aplicadas a coluna preparadas da seguinte maneira: 10 mg do material contendo aproximadamente 4 mg de proteína foram suspensas em 5 ml de solução tampão de Tris glicina, pH 8,8. Foram agitadas em vortex durante 5 minutos e posteriormente centrifugadas a 3000 x g durante 15 minutos. Do sobrenadante tomou-se alíquotas de 2,5 ml que foram aplicadas à coluna.

Para aplicar à coluna o extrato de proteínas em estado nativo, as amostras foram preparadas moendo num liquidificador a folha fresca com o tampão Tris glicina, pH 8,8 resfriado previamente. O homogeneizado foi filtrado sobre uma tela fina para eliminar o bagaço grosso e novamente filtrado sobre papel de filtro Whatman Nº 1 para eliminar o bagaço fino, mantendo as soluções constantemente num banho frio de água-gelo. Da solução filtrada, tomaram-se alíquotas contendo estimativamente 2 mg de proteína para ser fracionadas na coluna de sephadex.

III.6.5- Classificação das proteínas por solubilidade (classificação de Osborne)

Para estas determinações seguiram-se os delineamentos descritos por FOX e col. (1982). Amostras de 2 g dos concentrados protéicos foram colocadas em tubos de centrífuga e agitadas com 20 ml de água destilada durante 30 minutos a 25°C. Posteriormente foram centrifugadas a 3000 x g durante 20 minutos. O sobrenadante foi separado e o sedimento foi lavado 2 vezes com 20 ml de água destilada em cada operação, agitado durante 30 minutos a 25°C e centrifugado nas mesmas condições.

III.6.5.1- Albuminas

O sobrenadante e os lavados foram coletados e levados a um volume de 100 ml. Tomaram-se alíquotas de 5 ml em duplicata para a determinação de nitrogênio pelo método de micro-kjeldahl. O valor do nitrogênio multiplicado pelo fator 6,25 foi considerado como albuminas.

III.6.5.2- Globulinas

O produto sedimentado, da operação anterior, foi suspenso com 20 ml de uma solução de NaCl a 5% e mantido em agitação durante 30 minutos e centrifugado posteriormente por 30 minutos a 3000 x g. O sobrenadante foi coletado e os resíduos foram lavados sucessivamente 2 vezes com 20 ml de água destilada mediante agitação e centrifugação como descrito anteriormente.

Os sobrenadantes foram reunidos e levados a um volume de 100 ml dos quais tomaram-se alíquotas de 5 ml para a determinação de nitrogênio total, que calculada a proteína crua nos indica o conteúdo de globulinas.

III.6.5.3- Prolaminas

Posteriormente o resíduo sólido foi suspenso em etanol a 70%, agitado e centrifugado nas mesmas condições que nas operações anteriores. Os sobrenadantes também lavados a um volume final de 100 ml dos quais tomaram-se alíquotas em duplicata para a determinação de proteínas. O valor obtido de proteínas é indicativo do conteúdo de prolaminas.

III.6.5.4- Glutelinas

O sedimento foi finalmente tratado com 20 ml de uma solução de NaOH 0.1N procedendo-se de igual forma que nos casos anteriores. O valor de proteína determinado na solução representa o conteúdo de glutelinas.

III.6.5.5- Escleroproteínas

As proteínas insolúveis que ainda permanecem no resíduo sólido, são quantificadas como escleroproteínas.

III.7- Parâmetros nutricionais

III.7.1- Digestibilidade das proteínas "in vitro"

A digestibilidade "in vitro" das amostras estudadas foi determinada segundo o método de AKESON e STAHTMAN (1964) o qual consiste basicamente em submeter as amostras contendo aproximadamente 100 mg de proteína a uma hidrólise com 10 ml de uma solução de pepsina a 0,3% em HCl 0,1N e incubar durante 3 horas com agitação contínua a 37°C. Em seguida são agregados 10 ml de uma solução de pancreatina "Merck" a 0,4% em solução tampão de fosfato, pH 8,0 e 0,1 ml de "merthiolate" 1:1000 em solução alcoólica. Incubou-se a 37°C com agitação constante durante 24 horas. Posteriormente adicionou-se, sob agitação 10 ml de uma solução de ácido tricloroacético a 30% e levando-se a um volume de 50 ml com água destilada.

A suspensão foi centrifugada a 3000 x g durante 30 minutos. Uma alíquota de 5 ml foi tomada do sobrenadante e transferida para balão Kjeldahl para a análise de nitrogênio total. Simultaneamente efetuou-se o procedimento com 200 mg de caseína como controle e um branco para correção analítica.

Cálculo:

$$\% \text{ Digestibilidade} = \frac{\% \text{ Nitrogênio digerido}}{\% \text{ Nitrogênio na amostra}} \times 100$$

III.7.2- Cômputo químico

O índice químico das proteínas foi determinado com base nos valores obtidos nos aminogramas consignados nas Tabelas XVI e XVII, tomando como referência o padrão da FAO/OMS (1973).

$$\text{Cômputo} = \frac{\text{mg de aminoácido limitante por grama de proteína na amostra}}{\text{mg do mesmo aminoácido por grama de proteína padrão FAO/OMS (1973)}} \times 100$$

químico

III.7.3- Lisina disponível

Para a determinação da lisina disponível seguiu-se o método descrito por KAKADE e LIENER (1969) que consiste em se colocar em tubos de ensaio de 10 ml com tampa rosqueável 10 mg da amostra finamente moída em triplicata, agregando posteriormente 1 ml de ácido trinitrobenzeno sulfônico 0,1%. As amostras foram colocadas novamente num banho agitado a 40°C durante 2 horas. Adicionaram-se 3 ml de HCl concentrado, tapando-se os tubos perfeitamente e colocando-os em autoclave para hidrólise das amostras durante uma hora a 120 Lb/pol². Estas amostras foram resfriadas e agregou-se posteriormente 5 ml de água destilada e filtrando-se sobre papel de filtro.

As soluções filtradas foram extraídas duas vezes com éter etílico, eliminou-se o éter residual da fase aquosa colocando as amostras em banho-maria a 80°C durante 5 minutos.

As amostras foram levadas a 25 ml e lidas a 346 nm contra um branco preparado nas mesmas condições que as amostras à exceção da que foi adicionada de ácido clorídrico antes do ácido trinitrobenzeno sulfônico. As leituras foram comparadas com a curva padrão elaborada com epsilon-trinitrofenil-lisina.

III.7.4- Determinação de triptofano

Para a determinação de triptofano seguiu-se os delineamentos descritos por LOMBARD e LANGE (1965) que, basicamente, consiste em pesar em duplicata amostras do material contendo cerca de 600 mg de proteína e colocá-las em frascos erlenmeyer de 100 ml com tampa esmerilhada.

A cada frasco foram adicionados 25 ml de solução 0,05N de hidróxido de sódio, 10 ml de solução de enzima recém elaborada, preparada com duas gramas de papaína Merck em 100 ml de água; adicionaram-se também 10 gotas de solução de cianeto de sódio a 5% em água destilada.

Os frascos perfeitamente tampados, foram deixados na estufa a 70°C durante 18 horas, ao cabo das quais foram resfriados e o conteúdo de cada frasco foi transferido a balões aferidos e completando-se o volume a 100 ml com água destilada. Colocaram-se alíquotas em duplicata de 5 ml destes hidrolisados em tubos de centrífuga de 30 ml, adicionaram-se 5 ml de solução de KOH 0,1N e 3 ml de tetracloreto de carbono. Os tubos foram

agitados durante 10 minutos com ajuda de um Vortex e posteriormente centrifugados a 3000 x g durante 15 minutos.

Foram tomadas alíquotas de 1 ml em triplicata que foram colocadas em tubos de ensaio, duas das quais foram usadas para a determinação e a outra alíquota para o branco. Aos primeiros tubos adicionou-se 1 ml de para-dimetil-amino-benzaldeído a 5% em HCl concentrado e ao branco 1 ml de água destilada, posteriormente a cada um dos tubos adicionaram-se 5 ml de ácido clorídrico concentrado e agitou-se vigorosamente durante dois minutos. Deixou-se repousar por 10 minutos e adicionaram-se 2 gotas de solução aquosa de nitrito de sódio a 0,2% agitando-o novamente. Deixou-se repousar por 5 minutos para completar o desenvolvimento da cor. Leu-se no espectrofotômetro a 590 nm usando um branco para correção. As leituras foram comparadas com as da curva padrão de triptofano preparada nas mesmas condições usadas para as amostras.

III.7.5- Determinação do quociente de eficiência protéica (PER)

Para a determinação do quociente de eficiência protéica (PER) seguiram-se os procedimentos descritos no A.O.A.C., procedimento Nº 43.253. (1984).

Para cada amostra estudada usaram-se lotes de 6 ratos machos da raça "Wistar" recém desmamados de 21-23 dias de idade e peso médio de 45-50 g, os quais foram mantidos em gaiolas individuais durante o período de prova que foi de 28

dias. A água e as dietas contendo 10% de proteínas provenientes das amostras estudadas foram administradas "ad libitum".

A composição centesimal das dietas utilizadas para a determinação do PER é mostrada na Tabela VII.

Na Tabela VIII indica-se a composição da mistura de sais minerais e na Tabela IX a composição da mistura de vitaminas.

Os ingredientes das dietas foram misturados perfeitamente para obter a máxima homogeneidade e posteriormente determinou-se o conteúdo de proteína que oscilou entre 9,8 e 10,5% de proteína nas diferentes dietas.

Os ratos foram submetidos a um período de adaptação durante 2 dias com as dietas experimentais e depois deste período foram pesados novamente, para considerar como ponto inicial da experiência. Posteriormente foram efetuadas as pesagens regulares a cada 4 dias de cada um dos ratos e da ração consumida individualmente.

O valor de PER foi calculado com a fórmula seguinte:

$$\text{PER} = \frac{\text{Ganho de peso em gramas}}{\text{Gramas de proteína consumida}}$$

Os valores obtidos foram corrigidos a um valor de PER para caseína de 2,5.

Tabela VII - Composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos.

Componentes	Porcentagem
Proteínas	10,0
Mistura de sais minerais*	5,0
óleo de soja comercial	8,0
Fibra crua (celulose)	1,0
Amido de milho	50,0
Açúcar refinado	25,0
Misturas de vitaminas**	1,0

*Ver tabela VIII.

**Ver tabela IX.

Da porcentagem de açúcar, gordura, sais e fibra foram descontadas as existentes no material proteico estudado.

Tabela VIII - Composição centesimal da mistura salina usada nas dietas para os ensaios biológicos.

Componentes	%
Molibdato de amônio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,003
Carbonato de cálcio CaCO_3	29,990
Fosfato de cálcio CaHPO_4	0,430
Sulfato cúprico CuSO_4	0,156
Citrato férrico $\text{Fe}^{+3} + (\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O})_n$	0,620
Sulfato de magnésio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9,980
Sulfato de manganês $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,121
Iodeto de potássio KI	0,0005
Fosfato de potássio K_2HPO_4	34,310
Cloreto de sódio NaCl	25,060
Selenito de sódio Na_2SeO_3	0,002
Cloreto de zinco ZnCl_2	0,020

Fonte: ROGERS & HARPER (1965)

Tabela IX - Composição (mg/kg) da mistura vitamínica utilizada nas dietas para os ensaios biológicos.

Componentes	mg
Vitamina A concentrado (200.000 unidades/g)	4,500
Vitamina D concentrado (400.000 unidades/g)	250
α -Tocoferol	5,000
Ácido ascórbico	45,000
Inositol	5,000
Cloreto de colina	75,000
Menadiona	2,250
Ácido p-aminobenzóico	5,000
Niacina	4,500
Riboflavina	1,000
Cloridrato de piridoxina	1,000
Cloridrato de tiamina	1,000
Pantotenato de cálcio	3,000
Biotina	20
Ácido fólico	90
Vitamina B ₁₂	1,35
Sacarose	para 1,000,000

Fonte: NBC (1977-1978).

III.8- Propriedades funcionais

III.8.1- Capacidade de absorção de água

O método utilizado para esta determinação foi o de SOSULSKI (1962) que se baseia na determinação do incremento de peso de uma amostra de 1 g de peso colocado num tubo de centrífuga e misturando-a vigorosamente com 5 ml de água em um vortex marca Super Mixer durante 30 segundos. Esta operação foi repetida 2 vezes consecutivas com intervalos de 10 minutos de descanso e adição de 1 ml de água de cada vez. Lavaram-se as paredes do tubo com 3 ml de água destilada e posteriormente foi centrifugado durante 20 minutos a $4000 \times g$. Decantou-se o líquido sobrenadante e deixou-se escorrer a água residual deixando o tubo em posição inclinada a 20° a temperatura ambiente por espaço de 15 minutos.

O tubo contendo a amostra foi pesado e o incremento de peso foi relacionado com o peso da amostra para obter o valor da capacidade de absorção de água em porcentagem.

III.8.2- Capacidade de absorção de óleo

Para esta determinação seguiram-se os procedimentos descritos por LIN e col. (1974). A metodologia utilizada é similar a utilizada para a determinação de capacidade de

absorção de água, utilizando nesta ocasião óleo refinado de milho. O óleo residual foi escorrido nos tubos de centrífuga inclinados a 45° por 30 minutos. O incremento de peso da amostra foi relacionado, em porcentagem, com o peso da amostra para obter o valor da capacidade de absorção de óleo.

III.8.3- Capacidade de formação e estabilidade da espuma

Para esta determinação baseou-se no método descrito por HSU e col. (1982) e KABIRULLAH e WILLS (1982), para o qual prepararam-se suspensões a 3% (p/v) de cada uma das amostras estudadas em soluções tampões de pH 2 a 12.

Tomaram-se alíquotas de 30 ml que foram colocadas em recipientes de plástico de 500 ml de capacidade e foram agitadas vigorosamente durante 4 minutos a 1350 rpm com um misturador "Braun Multipratic". A suspensão espumosa foi transferida a uma proveta de 250 ml e depois de 30 segundos mediu-se o volume total da suspensão. A porcentagem do aumento do volume foi calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ de aumento de volume} = \frac{B - A}{A} \times 100$$

Onde: A = volume antes da agitação.

B = volume depois da agitação.

Para determinar a estabilidade da espuma deixou-se em repouso à temperatura ambiente e tomaram-se as leituras do volume total e da fase líquida aos 30 minutos.

Determinou-se a percentagem do líquido liberado da espuma segundo o indicado por JOHNSON e BREKKE (1983).

$$\% \text{ do líquido liberado da espuma} = \frac{A}{B} \times 100$$

Onde: A = volume de líquido liberado da espuma aos 30 minutos.

B = volume inicial antes da agitação.

III.8.4- Propriedades emulsificantes

III.8.4.1- Capacidade emulsificante

Para esta determinação seguiram-se os procedimentos descritos por CHOI e col. (1981) e HAUFFMAN (1975) para o qual foram preparadas suspensões das amostras em soluções tampão de pH 2 a 10, calculada para dar uma concentração final de 1% de proteína.

As suspensões foram colocadas num liquidificador "Waring Blendor" em sua máxima velocidade e imediatamente iniciou-se adição, mediante uma bureta graduada, óleo puro de milho a uma velocidade de 50 ml por minuto, a adição de óleo procedeu-se à medida que se observava a formação da emulsão. A incorporação de óleo foi suspensa no momento que foi observada a quebra da emulsão, percebida pela súbita queda da viscosidade

indicada pelo incremento da velocidade das hélices do liquidificador, assim como pela mudança do som do motor do liquidificador.

A capacidade emulsificante foi calculada pela máxima quantidade de mililitros de óleo utilizados para formar a emulsão em relação a 1 g de proteína.

III.8.4.2- Atividade e estabilidade da emulsão

Para estas determinações seguiram-se os procedimentos descritos por WANG e KINSELLA (1976a). Prepararam-se suspensões com os concentrados protéicos a estudar, contendo aproximadamente 2% de proteína em água destilada (2,5 g de amostra em 50 ml de água), ajustou-se ao pH desejado de 2 a 10 e as suspensões foram homogeneizadas num liquidificador de alta velocidade, adicionando-se lentamente 10 ml de óleo de milho, mantendo-se à velocidade máxima durante 3 minutos. O homogeneizado resultante foi dividido em duas partes iguais: partes A e B, que foram colocadas em tubos graduados de centrífuga e foram medidos os volumes correspondentes. Para as determinações da atividade de emulsão, a parte A foi centrifugada a 1300 x g durante 15 minutos posteriormente mediu-se o volume da emulsão formada e a porcentagem de atividade emulsificante foi calculada pela seguinte relação:

$$\% \text{ AE} = \frac{\text{Volume da capa de emulsão}}{\text{Volume total}} \times 100$$

Para a determinação da estabilidade da emulsão utilizou-se a parte B a qual foi aquecida em banho maria a 80°C durante 30 minutos, deixou-se resfriar a temperatura ambiente e centrifugou-se nas mesmas condições que as amostras anteriores.

O volume da emulsão foi medida e relacionada com o volume total, da mesma maneira que nas determinações anteriores.

IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1- Composição das folhas de mandioca

Na Tabela X expressa-se a composição centesimal da folha de mandioca em base úmida e em base seca.

O conteúdo de proteína crua em base seca, resultou num valor de 22%, esta cifra foi inferior quando comparada com os limites que menciona COSTES (1981) compreendidos entre 24,1% e 31,6% de proteína. Outros autores como HAHN (1984) relatam limites para a folha de mandioca de 20 - 32 %. No entanto, MOJARRO (1982) encontrou conteúdos de proteínas para esta mesma variedade (PAN-MEX 51) de 16 e 26% dependendo do lugar de origem. TORRES (1980) relata uma faixa de 16 - 30% de proteínas para folhas de mandioca de outra variedade e procedência.

O conteúdo médio de proteínas de folha de mandioca é muito variável, mas resulta favoravelmente quando comparado com outros materiais foliares. NAGY e col. (1978) num estudo comparativo de conteúdos de proteínas de folhas de 60 diferentes plantas tropicais, situa as folhas de mandioca entre as dez primeiras, como de maior conteúdo protéico. YEOH e col. (1976) mencionam conteúdos de proteína de folhas de mandioca cultivadas na Malásia de 29 até 38,6% em base seca.

Tabela X - Composição centesimal das folhas de mandioca.

	Base úmida %	Base seca %
Umidade	76,50	-----
Proteína	5,17	22,00
Fibra crua	3,10	13,19
Extrato etéreo	3,76	16,00
Cinzas	1,35	5,74
Carboidratos	10,12	43,07

IV.2- Solubilidade das proteínas de folhas de mandioca

Nas figuras 6 e 7 mostram-se as curvas de solubilidade de nitrogênio protéico e não protéico das folhas de mandioca a valores de pH de 2 a 12 e a temperatura de 25° e 45°C.

No presente trabalho a solubilidade do nitrogênio das folhas foi menor a 45°C que a 25°C. Segundo MUSTAKAS e SOHNES (1979) uma elevação na temperatura provoca um incremento na solubilidade das proteínas de soja igual a 0,25% por grau centígrado entre 15° e 80°C, enquanto que no caso da colza, 45°C constitui a temperatura de solubilização ótima (GILLBERG e TURNELL, 1976). Porém estas temperaturas terão efeitos negativos na solubilidade de muitas outras proteínas, já que o calor provoca a coagulação térmica das proteínas, tornando-as insolúveis.

A solubilidade do nitrogênio protéico da folha de mandioca determinada no presente trabalho a 25°C foi máxima a pH 12 e difere um pouco da efetuada por TORRES (1980) que encontrou a máxima solubilidade a pH 11 e um ligeiro decréscimo de solubilidade a pH 12. De acordo com os conceitos de BEROT e DAVIN (1985) esta diferença poderia atribuir-se a variedade da planta e condições de cultivo, isto também é confirmado por GUEGUEN e col. (1982) citado por BEROT e DAVIN (1985) nas curvas

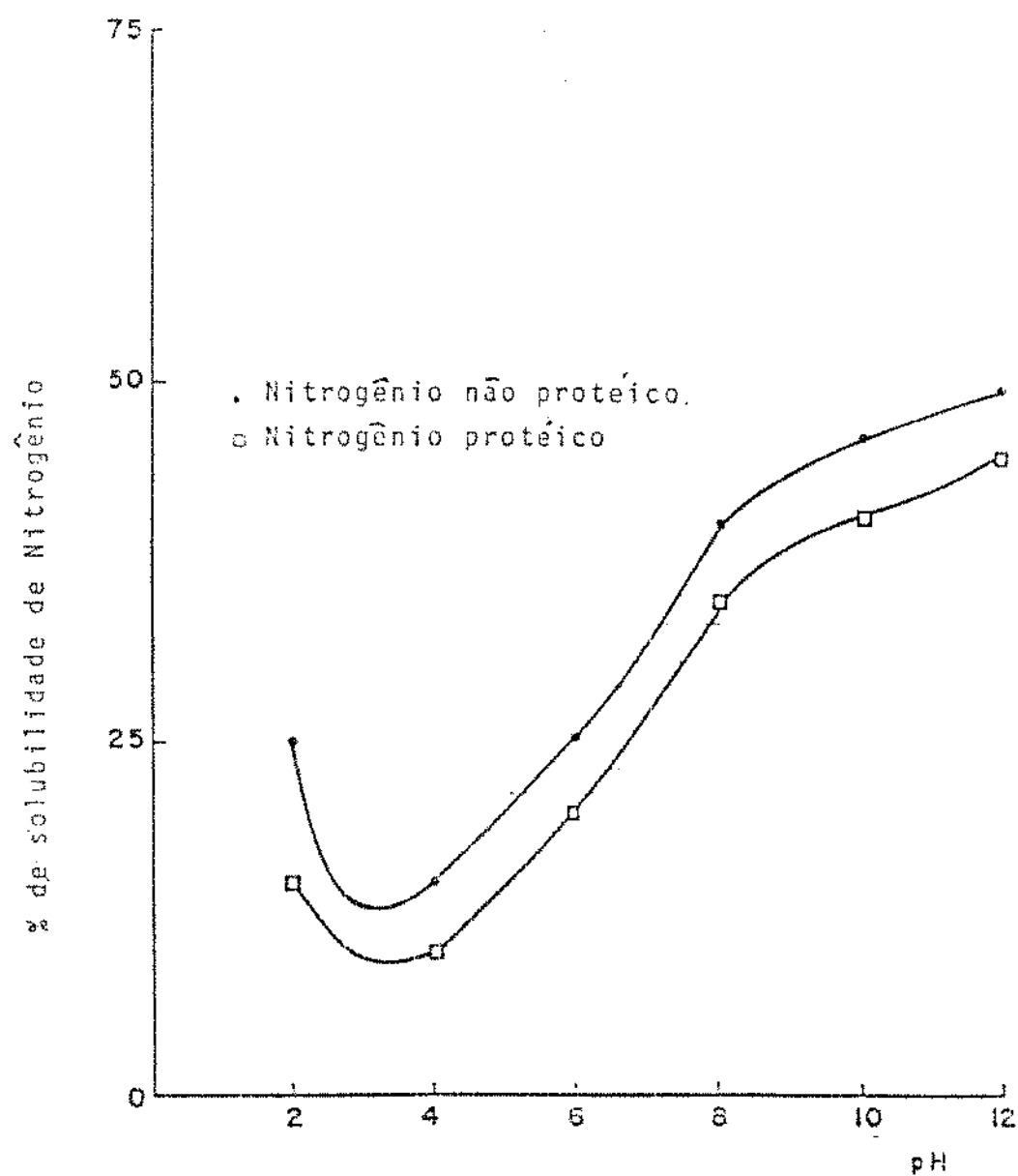


Figura 6 - Solubilidade do nitrogênio proteico e não proteico das folhas da mandioca em função do pH a 25°C.

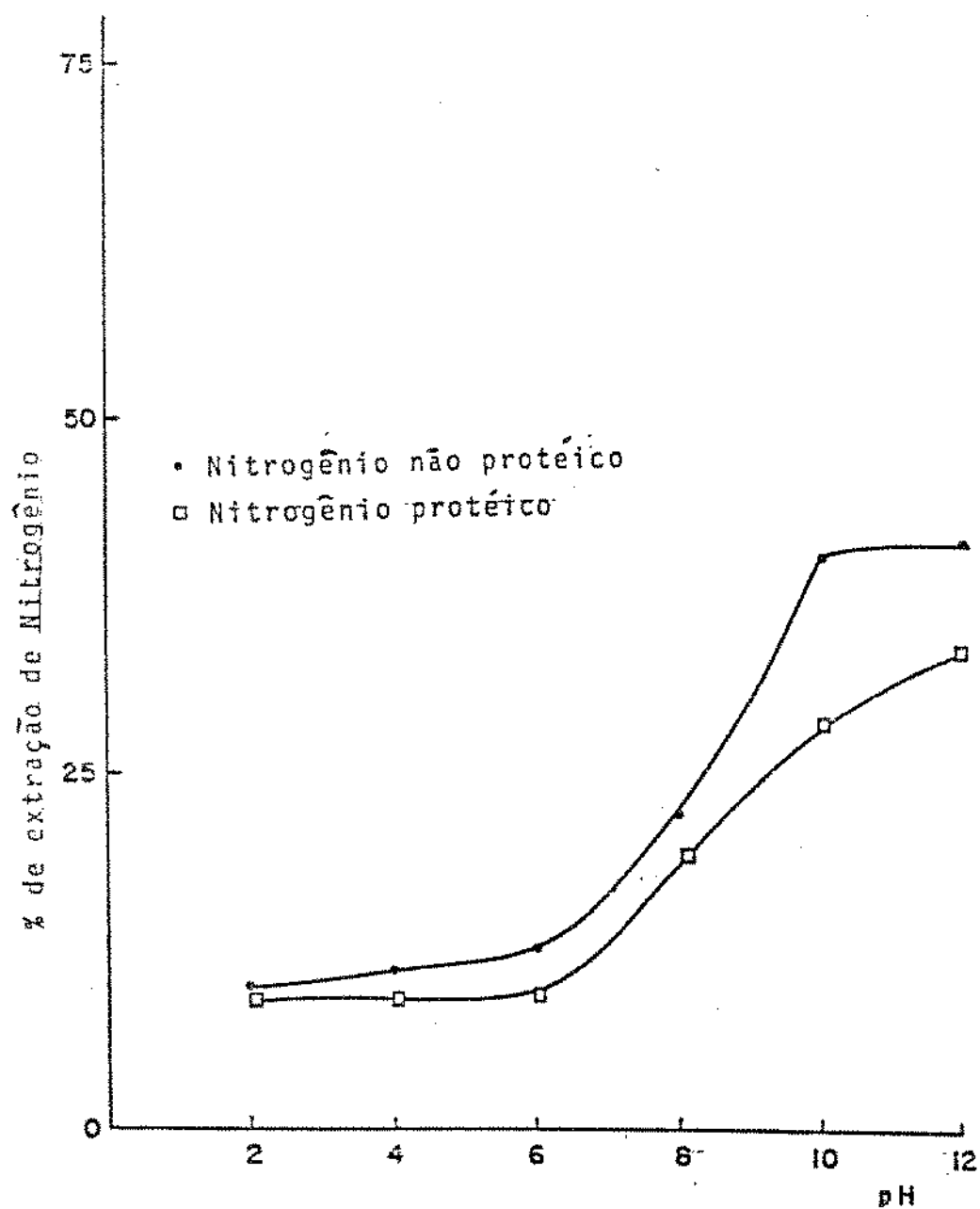


Figura 7 - Solubilidade do nitrogênio protéico e não protéico das folhas de Mandioca em função do pH a 45°C.

de solubilidade para proteínas de ervilhas de 4 variedades diferentes.

A curva de solubilidade das proteínas da matéria-prima representa a resultante do comportamento de todas as proteínas que ela contém e as variações observadas podem advir da sua natureza, da presença de outros constituintes, da variedade, das condições do cultivo e da história da matéria-prima (BEROT e DAVIN, 1985).

IV.2.1- Efeito da força iônica na solubilidade das proteínas

O efeito da concentração de metabissulfito de sódio sobre a extração das proteínas da folha de mandioca pode ser observada na figura 8, na qual expressam-se estes valores a diferentes pH e a uma temperatura de 25°C.

Realizaram-se provas a concentrações de metabissulfito de sódio de 0,0M; 0,1M; 0,2M; 0,3M e 0,4M e como pode observar-se, a concentração de 0,1M resultou ser a mais adequada pelo fato de acentuar significativamente a extração das proteínas.

O efeito da concentração de sais que confere ao solvente determinada força iônica e que influi diretamente sobre a solubilidade das proteínas vegetais em função do pH, tem sido revisado por diferentes autores, GUEGUEN (1982) citado por BEROT e DAVIN (1985) que estudou a solubilidade das proteínas de favas com diferentes concentrações de CaCl_2 e encontrou que baixas

concentrações (0,03M) tendem a diminuir a solubilização das proteínas na faixa da neutralidade, mas a concentrações maiores (0,1M) a solubilidade incrementa-se notavelmente. No entanto, RHEE e col. (1972) em estudos da extração de proteínas de amendoins encontraram que concentrações desde 0,01 a 1,0M de CaCl_2 diminui a solubilidade das proteínas a pH alcalino. Estes mesmos autores encontraram que o perfil de solubilidade das proteínas de amendoim se comporta de maneira muito diferente com NaCl, com o qual se obtém melhor solubilização a baixas concentrações a pH alcalino.

No caso da soja, McWATTERS e HOLMES (1979) encontraram que a solubilidade incrementa-se notavelmente em concentrações 1,0M de NaCl sem apresentar o decréscimo da solubilidade na região isoelétrica (pH 4) como o apresenta a curva de solubilidade da mesma proteína usando NaCl 0,1M.

A curva de solubilidade em função do pH e da força iônica determinada para as proteínas de folha de mandioca no presente trabalho, difere da obtida por TORRES (1980) na qual a solubilização máxima se obteve com concentração de metabis-sulfito de sódio 0,4M e neste caso resultou ser de 0,1M a concentração mais apropriada. Esta diferença pode ter sido originada pelas mesmas razões que se atribuem a da curva de solubilidade em função do pH, referente as diferenças que se encontram segundo a espécie e variedade das plantas.

A concentração de metabissulfito de sódio 0,1M que se encontrou para incrementar a extração das proteínas, corresponde aproximadamente a uma solução 2%. Esta concentração

serviu de base neste trabalho para as extrações posteriores. No caso da alfafa PETIT (1981) menciona a conveniência do uso do bissulfito na extração de proteínas foliares em virtude de que o material vegetal é rico em fenóis e que num meio alcalino e a presença de ar pode causar a produção de produtos de oxidação fortemente coloridos. Estes produtos também podem ligar-se às proteínas diminuindo a sua solubilidade e o seu valor nutritivo.

Segundo os trabalhos de KNUCKLES e col. (1980a) por ultrafiltração e diafiltração pode-se remover até 86% de compostos hidroxifenólicos do suco de alfafa clarificado. Os níveis de metabissulfito necessários para inibir totalmente as reações de escurecimento nos extratos de plantas são muito elevados, no entanto estes mesmos autores mencionam que o sistema de ultrafiltração pode ser modificado para minimizar a oxidação e reduzir a necessidade de bissulfito.

COHEN e col. (1956) relatam o uso de atmosferas de nitrogênio para prevenir as reações de escurecimento durante a preparação de frações protéicas de folhas de tabaco.

BURGHOFFER e col. (1987) em estudos sobre o procedimento industrial de extração de proteínas brancas de alfafa, explicam a ação benéfica da adição de metabissulfito de sódio para minimizar as reações de hidrólise das proteínas durante o processamento. No presente trabalho o metabissulfito de sódio utilizado também melhorou a extração das proteínas (Figura 8).

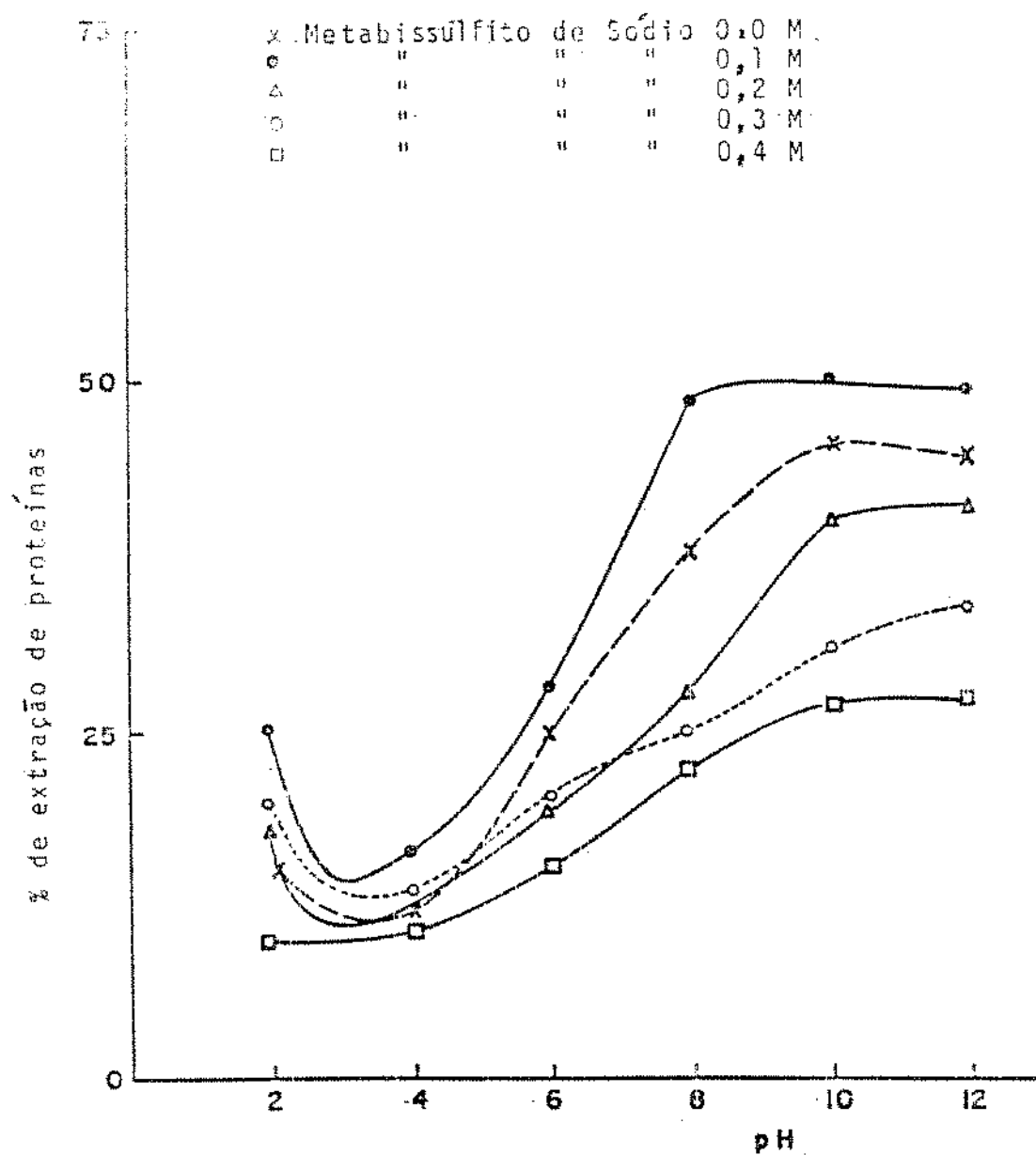


Figura 8 - Efeito de diferentes cocentracões de metabissulfito de sódio na solubilidade das proteínas foliares de mandioca em função do pH a 25°C

IV.3- Concentração do extrato foliar por ultrafiltração

Na figura 9 encontra-se graficado o comportamento da concentração do extrato alcalino das folhas de mandioca com respeito a velocidade do fluxo do "permeado", a concentração de sólidos solúveis no "permeado" e no "retido" e nitrogênio total no "retido" com respeito ao tempo de operação a 25°C.

O volume do extrato processado foi de 60 litros com um conteúdo de sólidos solúveis de 1,1% e nitrogênio total de 0,40 g/litro e o volume final do retido foi de 8 litros com um conteúdo de 4,4% de sólidos solúveis e 3,0g de nitrogênio total/litro. O tempo de operação foi de 90 minutos e o fator de concentração resultante com relação ao volume foi de 7.5.

Como se pode observar na figura 9 o fluxo do permeado decresce de 32 l/m² x h para 18 l/m² x h à medida que se incrementa a concentração de sólidos solúveis no permeado e o nitrogênio total do retido, assim como a concentração dos sólidos no permeado.

O comportamento de velocidade do fluxo nesta operação de ultrafiltração a 25°C é similar ao manifestado por KNUCKLES e col. (1980a) em estudos de ultrafiltração de suco de alfafa clarificado (prévia eliminação da proteína cloroplástica fracionada a 60°C).

A diminuição da velocidade de permeação é explicada pelo conceito de "polarização da concentração", na qual a

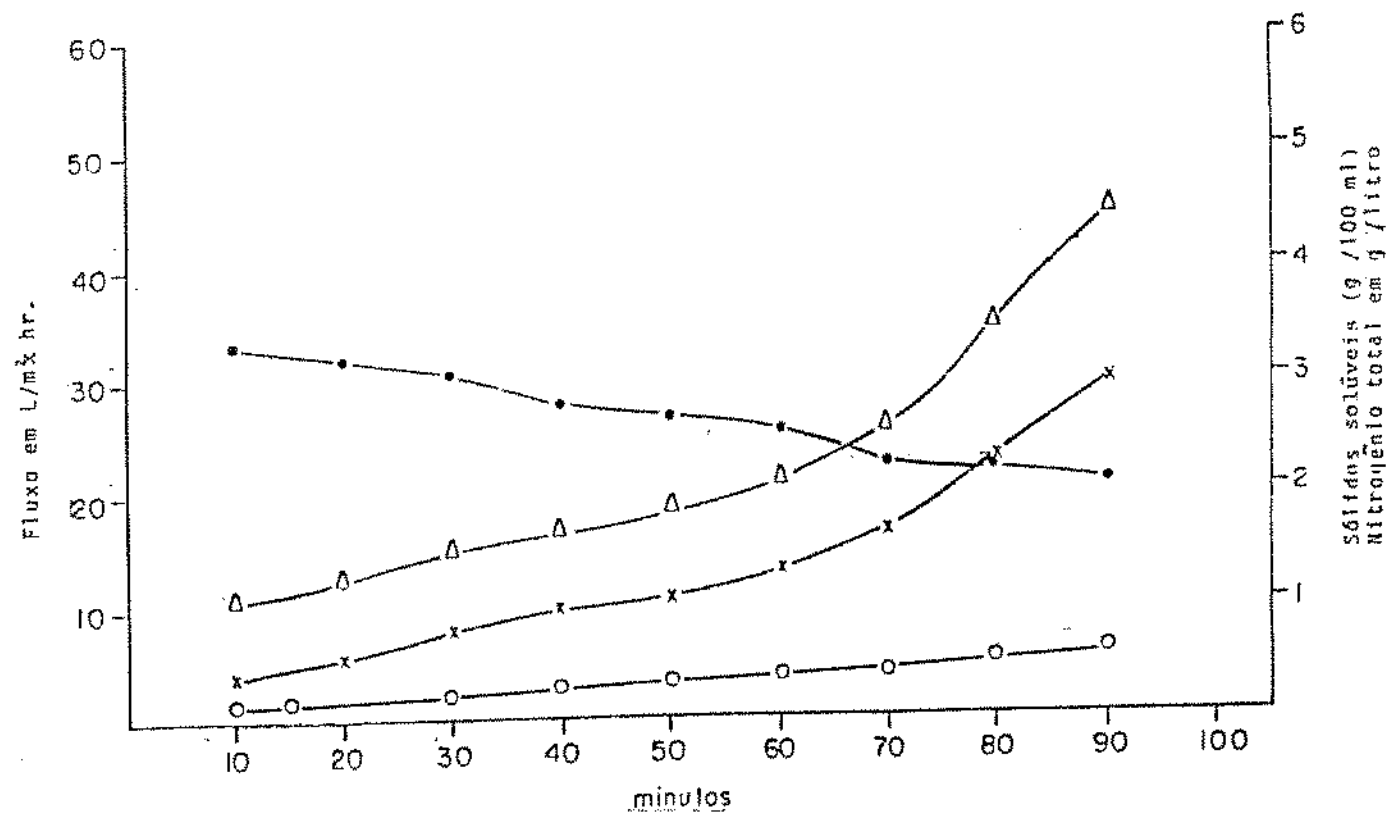


Fig. 9 Comportamento da ultrafiltração do extrato foliar de mandioca a 25°C. Fluxo do permeado (●), concentração de sólidos solúveis no permeado (○), sólidos solúveis no retido (Δ), concentração de nitrogênio total no retido (x). Pressão de entrada 2 kg x cm².

concentração do material retido é muito mais alta na superfície interna da membrana que no total da solução.

Em alguns casos a velocidade de permeação não é em função da membrana, mas sim, pela formação de uma capa de material retido adjacente à superfície da membrana, como consequência da acumulação de misturas gelatinosas e viscosas que oferecem uma resistência extra para a transferência de moléculas através da membrana, reduzindo a velocidade de permeação (LEWIS, 1982; EAKIN e col., 1978).

Nas figuras 10 e 11 expressam-se os comportamentos da ultrafiltração a 40 e 50°C respectivamente de extratos de folhas de mandioca nos quais pode-se apreciar que a velocidade de permeação foi incrementada consideravelmente com respeito a ultrafiltração a 25°C. A 40°C a velocidade de permeação foi de 45 l/m² x h no início e de 32 l/m² x h no final. O tempo para concentrar 60 litros a um volume de 8 litros foi de 60 minutos.

No caso da ultrafiltração a 50°C a velocidade de permeação foi o dobro da resultante a 25°C. A 50°C o fluxo foi de 65 l/m² x h no início e de 38 l/m² x h no final. O tempo requerido para concentrar 60 litros a um volume final de 8 litros foi de 45 minutos.

Este incremento da velocidade está de acordo com o descrito em trabalhos de outros autores como os de LEWIS (1982), que afirma que quando a velocidade de permeação é graficada contra a temperatura, a relação é quase sempre linear.

EAKIN e col. (1978) ultrafiltrando extrato protéico foliar de alfafa a 10, 20 e 35°C também encontrou um incremento

da velocidade de permeação proporcional ao incremento da temperatura. Este aumento da velocidade de permeação ao elevar a temperatura foi atribuída à mudança de porosidade da membrana e aumento da solubilidade do material que se difunde através da membrana.

Na ultrafiltração a 25°C, a concentração de sólidos solúveis e de nitrogênio no retido chegou a ser de 4,4% e de 3,0 g/l, respectivamente, no entanto na ultrafiltração a 50°C estes mesmos valores foram de 4,8% para sólidos solúveis e 2,8 g/l para nitrogênio total. O fato de que a 25°C se tenha retido um pouco mais de nitrogênio, pode ser explicado devido que nessa temperatura é maior a polarização da concentração, com consequente maior formação da capa gelatinosa adjacente a superfície da membrana da que se efetua a 50°C e por conseguinte, há a diminuição da velocidade de permeação. Este mesmo fenômeno se apresentou nos trabalhos de EAKIN e col. (1978) no qual à medida que a velocidade de permeação diminuiu, aumentou a seletividade da capa gelatinosa para reter mais proteína.

No trabalho publicado por EAKIN e col. (1978) para fracionar proteína de alfafa por ultrafiltração e no publicado por KNUCKLES e col. (1980a) em estudos sobre ultrafiltração em escala piloto para suco de alfafa clarificado, foi selecionada a temperatura de 10°C já que a de 20°C poderia apresentar crescimento microbiano e a de 40°C a precipitação da proteína com a consequente obstrução da membrana.

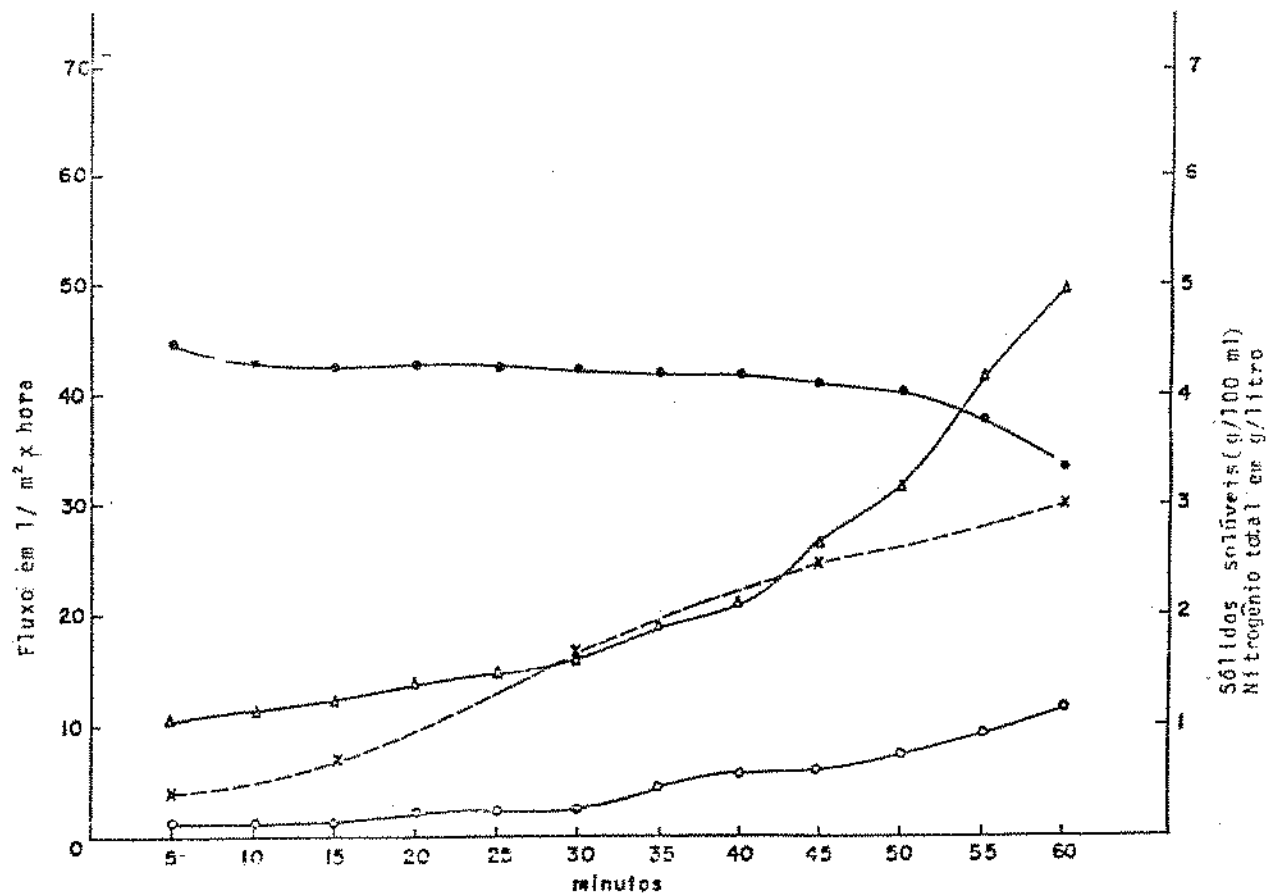


Fig. 10 Comportamento da ultrafiltração do extrato foliar de mandioca a 40°C.
Fluxo do permeado (*), concentração de sólidos solúveis no permeado (o),
sólidos solúveis no retido (Δ), concentração de nitrogênio total no re-
tido (x). Pressão de entrada 2 kg x cm².

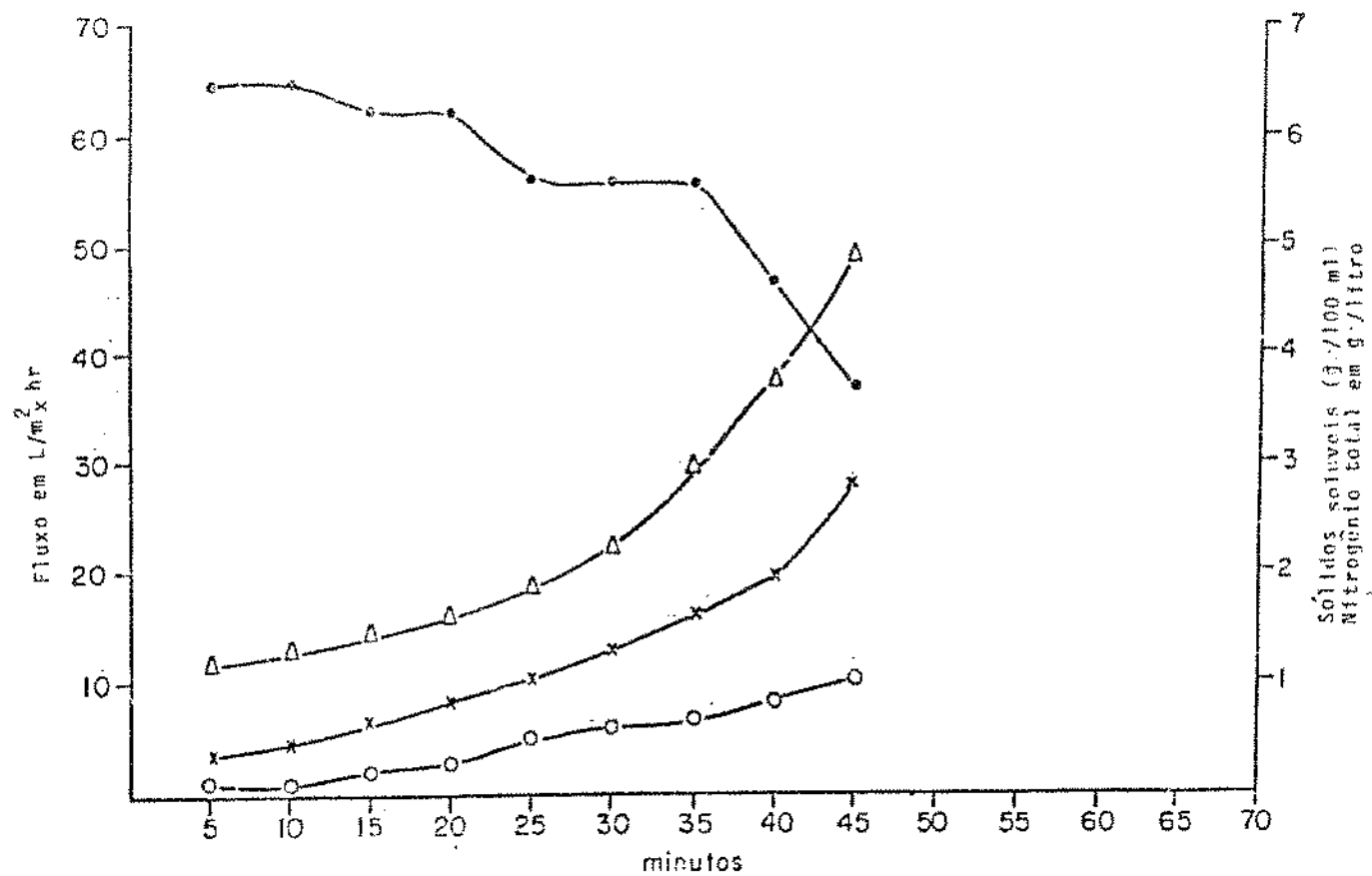


Fig. 11 - Comportamento da ultrafiltração do extrato foliar de mandioca a 50°C.
 Fluxo do permeado (●), concentração de sólidos solúveis no permeado (○)
 sólidos solúveis no retido (Δ), concentração de nitrogênio total no
 retido (x), Pressão de entrada 2 kg x cm².

Uma diferença notória no processo de ultrafiltração do extrato de folha de mandioca em relação ao de alfafa, é o fato de que a operação de ultrafiltração pode ser levada a cabo a altas temperaturas pela propriedade que apresenta o extrato de folha de mandioca de que as suas proteínas não precipitam a temperaturas até 85°C em pH acima de 7,0. Isto é de grande vantagem para a ultrafiltração de proteínas de folhas de mandioca, devido a que pode-se processar a temperaturas altas para aumentar a velocidade de permeação, diminuir o tempo do processo e impedir o crescimento microbiano. A este respeito LEWIS (1982) recomenda não usar temperaturas entre 5°C e 45°C e assinala que no uso de membranas não celulósicas é desejável aplicar altas temperaturas. No presente trabalho optou-se pelo uso da temperatura de 50°C por considerá-la apropriada para minimizar o crescimento microbiano e não causar reações indesejáveis as proteínas em solução.

Na Tabela XI são apresentados conteúdos de sólidos solúveis no retido e no permeado e o nitrogênio total no retido, assim como a velocidade de permeação no processo de diafiltração a 25, 40 e 50°C.

Como no caso da ultrafiltração, a velocidade de permeação durante a diafiltração se viu fortemente influenciada pelo incremento da temperatura aumentando o conteúdo de sólidos e nitrogênio no retido, assim como os sólidos no permeado, no entanto, as determinações de nitrogênio protéico pelo método do ácido tricloroacético e a determinação de proteínas pelo método espectrofotométrico nos permeados deram resultados negativos.

Tabela XI - Comportamento da diafiltração de extratos das folhas de mandioca a 25°C, 40°C e 50°C. Volume inicial de 60 l. Volume final de 6 l.

Temperatura	Tempo Minutos					
	0	5	15	20	25	30
Fluxo do permeado l/m ² x h						
25°C	---	78,8	60,2	52,0	48,0	44,0
40°C	---	120,6	97,4	88,0	83,5	
50°C	---	143,0	130,0	102,0		
Sólidos solúveis no retido %						
25°C	0,5	0,9	1,8	3,1	4,3	5,62
40°C	0,6	1,0	3,1	4,2	6,0	
50°C	0,6	2,0	4,0	6,3		
Sólidos solúveis no permeado %						
25°C	---	0,1	0,2	0,2	0,3	0,4
40°C	---	0,1	0,2	0,3	0,4	
50°C	---	0,1	0,2	0,4		
Nitrogênio total no retido em g/l						
25°C	0,38	0,80	1,2	1,8	2,5	3,5
40°C	0,40	0,90	1,1	1,9	3,2	
50°C	0,38	0,80	1,1	3,1		

Com o processo de diafiltração logrou-se eliminar quantidades consideráveis de sólidos ainda remanescentes no retido da ultrafiltração e obter assim um concentrado protéico com menores quantidades de sólidos não protéicos (Tabela XI). A redução de sólidos no retido, devido a diafiltração, concorda com os trabalhos de KNUCKLES e col. (1980a) com suco de alfafa clarificado., mas eles encontraram uma baixa retenção de proteínas, atribuída à proteólise ocorrida durante o processo e ao tamanho dos poros da membrana.

No presente trabalho, durante o processo de ultrafiltração e diafiltração recuperou-se a totalidade das proteínas presentes no suco original, como o demonstrou a ausência de proteínas nos permeados determinados por nitrogênio protéico e pelo, método espectrofotométrico de GROVES e col. (1969). Do mesmo modo, nos padrões eletroforéticos de amostras do retido, durante a ultrafiltração, não se observaram mudanças que indicassem hidrólises (ver figura 12).

IV.4- Rendimentos dos concentrados protéicos foliares

A Tabela XII mostra os valores das porcentagens de concentrados protéicos obtidos, calculados a partir do peso das folhas em base seca, assim como também as porcentagens de

proteínas nos concentrados e a de recuperação do total da proteína presente na folha.

Para estas determinações usaram-se folhas do mesmo lote para poder comparar os rendimentos, através dos resultados obtidos (Tabela XII) pode-se constatar que a ultrafiltração a 25, 40 e 50°C supera vantajosamente a recuperação das proteínas em comparação com a termocoagulação ácida e, mais notoriamente, com a precipitação isoelétrica.

Esta maior recuperação de proteínas foliares usando a ultrafiltração, em comparação com a obtida por precipitação, foi explicada por HUMPHRIES (1982). OSTROWSKI-MESSNER (1980) num estudo de quantidade e qualidade de proteínas obtidas a partir de pastos, usando comparativamente termocoagulação e ultrafiltração, encontrou 38,7% de recuperação de proteínas usando termocoagulação e 44,1% de recuperação por meio da ultrafiltração.

No presente trabalho a menor recuperação de proteínas que se obtem quando se utiliza precipitação isoelétrica, que foi de 14,97%, pode-se explicar em base a curva de solubilidade das proteínas da folha de mandioca (Figuras 6 e 7), na qual pode-se observar que ao redor de 13% do total da proteína permanece na solução no pH do ponto isoelétrico. Com a termocoagulação ácida, obteve-se um maior rendimento, de 20,84%, ainda assim permanecem proteínas de baixo peso molecular dissolvidas no líquido sobrenadante (Figura 16).

Tabela XII - Rendimentos de concentrado protéico, porcentagem de proteína nos concentrado e porcentagem de proteína recuperada a partir das folhas de mandioca (com 22% de proteína em base seca).

Tratamento	concentrado* proteico obtido %	proteína no concentrado %	proteína recuperada da folha %
Ultrafiltração a 25°C	15,45	39,00	27,06
Ultrafiltração a 40°C	14,54	41,03	26,29
Ultrafiltração a 50°C	15,45	41,60	28,86
Termocoagulação ácida	11,30	40,50	20,84
Precipitação isoeletrica	8,60	38,30	14,97

*Rendimentos calculados a partir da folha em base seca.

Com a utilização da ultrafiltração foi possível recuperar a totalidade das proteínas extraídas, que neste caso foi perto de 28% de recuperação.

No processo PRO-XAN que utiliza termocoagulação para obtenção de proteína foliar de alfafa, segundo KOHLER e BICKOFF (1971) a recuperação de proteínas é de 10,36% no concentrado protéico e 10,09% no suco residual.

IV.5- Estabilidade das proteínas durante a ultrafiltração

As proteases presentes nos cloroplastos e nos vacúolos das folhas que se liberam durante a moagem podem degradar rapidamente as proteínas celulares. O pH alcalino (pH 8) durante a ultrafiltração é de extrema importância pelas reações de hidrólise das proteínas que podem ocorrer. DE FREMERY e col. (1972) em trabalhos sobre estabilidade de pigmentos e proteínas durante o armazenamento do suco de alfafa, encontraram que mais de 50% de proteína se hidrolisa num período de 4 horas a 50°C a pH 5,5 que é o pH no qual se encontra a máxima atividade proteolítica. No entanto, TOZZI e col. (1981) relataram o isolamento de uma protease de alfafa com atividade máxima a pH 7 - 9.

Neste caso as condições de ultrafiltração em relação ao pH e tempo de operação minimiza as reações de proteólise como

se pode observar nos padrões eletroforéticos de amostras tomadas a tempos de 0, 15, 30 e 45 minutos durante o processo de ultrafiltração, como mostram as figuras 12 e 13.

IV.6- Composição centesimal dos concentrados protéicos foliares

Na Tabela XIII é mostrada a composição centesimal dos concentrados protéicos de folha de mandioca obtidos por ultrafiltração a 25, 40 e 50°C em base seca e em base úmida e na Tabela XIV a composição centesimal do concentrado obtido por termocoagulação.

Como se pode observar, o conteúdo de proteína bruta em base seca, apresenta pouca diferença nos concentrados protéicos quando são obtidos por ultrafiltração a diferentes temperaturas de operação, no entanto percebe-se uma retenção um pouco maior de cinzas no ultrafiltrado a 25°C e uma pequena diminuição da fibra crua no ultrafiltrado a 50°C.

Pelos resultados anteriores, pode-se deduzir que a temperaturas de ultrafiltração entre 25°C e 50°C não se observa efeitos significativos na composição dos concentrados protéicos.

O conteúdo de proteínas nestes concentrados protéicos obtidos por ultrafiltração de 41,7, 44,11% e 43,97% e o obtido por termocoagulação de 42,92%, resultam ser similares ao obtido por RUIZ (1985) de 45% e ligeiramente inferior que o

Tabela XIII - Composição centesimal de concentrados protéicos foliares de mandioca obtidos por ultrafiltração.

Determinação	concentrado protéico ultrafiltrado a 25°C		concentrado protéico ultrafiltrado a 40°C		concentrado protéico ultrafiltrado a 50°C	
	Base úmida %	Base seca %	Base úmida %	Base seca %	Base úmida %	Base seca %
Umidade	6,50	---	7,00	---	5,40	---
Proteína crua (N x 6,25)	39,00	41,71	41,03	44,11	41,60	43,97
Cinzas	7,00	7,48	5,15	5,68	5,68	6,00
Extrato Etéreo	12,50	13,37	14,75	15,86	12,29	12,99
Fibra crua	1,40	1,50	1,50	1,61	1,00	1,06
Carboidratos	33,60	35,94	30,57	32,89	34,04	35,98

Tabela XIV - Composição centesimal de concentrado protéico foliar de mandioca obtido por termocoagulação.

Determinação	Base úmida %	Base seca %
Umidade	6,80	----
Proteína crua (N x 6,25)	40,0	42,92
Cinzas	8,15	8,74
Extrato etéreo	12,15	13,04
Fibra crua	1,60	1,72
Carboidratos	31,30	33,58

mentionado por MOJARRO (1982) para esta mesma variedade, obtido por termocoagulação ácida de 49 - 52% de proteína. O teor de cinzas, resultou mais elevado no concentrado obtido por termocoagulação que no obtido por ultrafiltração, já que este processo permite maior eliminação dos sais.

IV.7- Comportamento eletroforético

Os padrões eletroforéticos das amostras estudadas mostram algumas diferenças importantes ao serem comparadas entre elas. O concentrado protéico ultrafiltrado (figuras 14, 15B) e o extrato protéico original (figuras 12 e 13B) apresentam semelhança quanto ao número e posição das bandas e em menor grau com as proteínas nativas (figuras 14 e 15E), apresentando ainda algumas variações referente à sua proporção relativa.

Nestas três amostras, pode-se observar 8 bandas sendo que as mesmas são mais bem definidas no concentrado protéico ultrafiltrado. Também se pode observar nos densitogramas, a presença de uma banda característica de peso molecular acima de 43.000.

Nos trabalhos de eletroforese de proteínas solúveis sem fracionamento de folhas de ervilhas, espinafres, cevada e milho mencionados por COSTES (1981), constata-se também a presença de uma fração protéica de alto peso molecular que se

identifica com a enzima ribulose 1.5 di-fosfato carboxilase e a assinala como a proteína mais abundante nas proteínas foliares.

HOOD e BRUNNER (1976) em estudos eletroforéticos para caracterizar parcialmente as proteínas solúveis de alfafa, encontram grande heterogeneidade eletroforética em albuminas e globulinas dos extratos de alfafa fresca fracionada com sulfato de amônio. Em ambas as frações constatou-se a presença de bandas de alto peso molecular. A fração de globulina apresentou 10 bandas e a fração albumina 12 bandas.

KLECZKOWSKA (1976) mencionado por HOOD e BRUNNER (1976) detectou 16 bandas em eletroforeses de extrato protéico de alfafa, não fracionada. A heterogeneidade eletroforética observada nas proteínas nativas (figura 15E) e extrato protéico original (figura 13B) é similar à observada no concentrado protéico ultrafiltrado (figura 15B), o que permite assumir que não houve alterações significativas nas proteínas durante o processo de obtenção por ultrafiltração.

Nos concentrados protéicos termocoagulados e isoelétrico (figuras 14, 15C, 15D, 16, 17B e 17C) assim como também no sobrenadante da termocoagulação (figura 16 e 17D) observaram-se densitogramas diferentes as amostras anteriores com a característica comum de apresentar as bandas de alto peso molecular (acima de 43.000) muito diminuídas na sua concentração relativa, enquanto que se percebe um ligeiro incremento nas bandas de menor peso molecular. Isto sugere a possibilidade de que as frações protéicas de alto peso molecular tenham sido

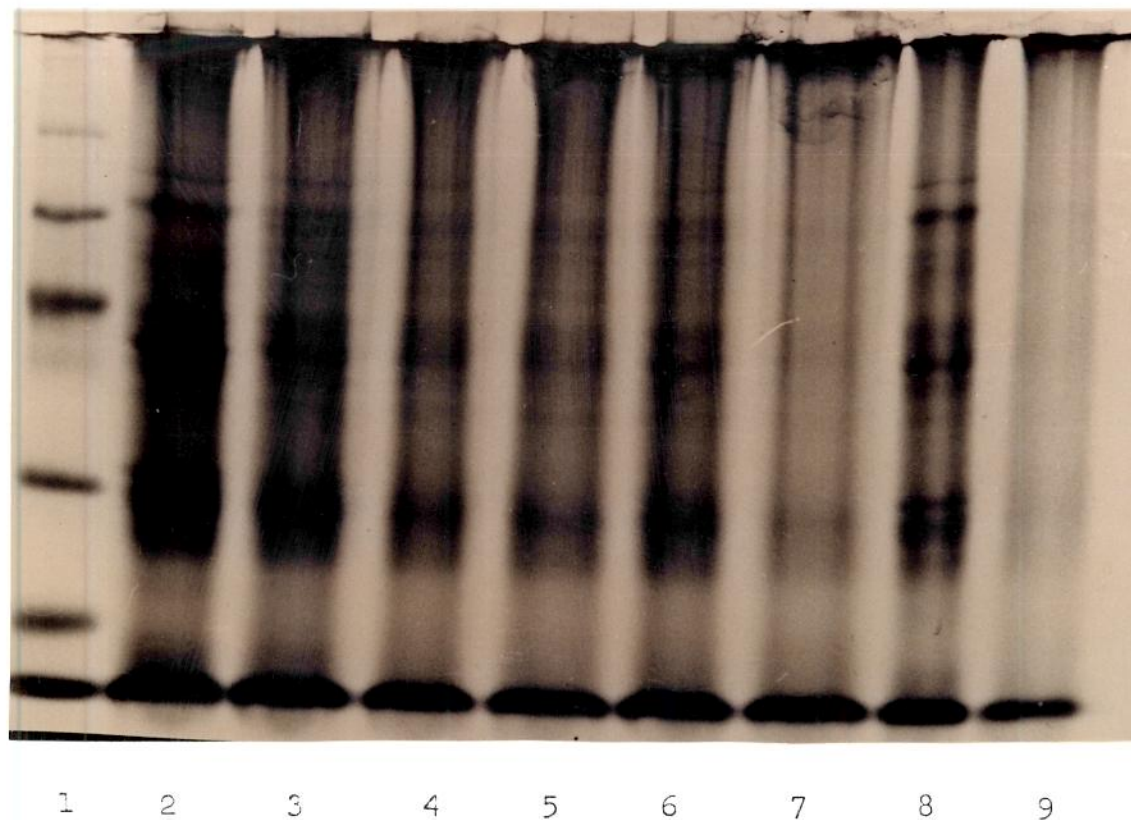


Figura 12 - Eletroforese em gel poliacrilamina-dodecil sulfato de sódio de extrato de proteínas das folhas de mandioca durante a ultrafiltração a 50°C.

Amostras:

1- Marcadores
2 e 3- Extrato original

4 e 5- Extrato 15 minutos
6 e 7- Extrato 30 minutos
8 e 9- Extrato 45 minutos

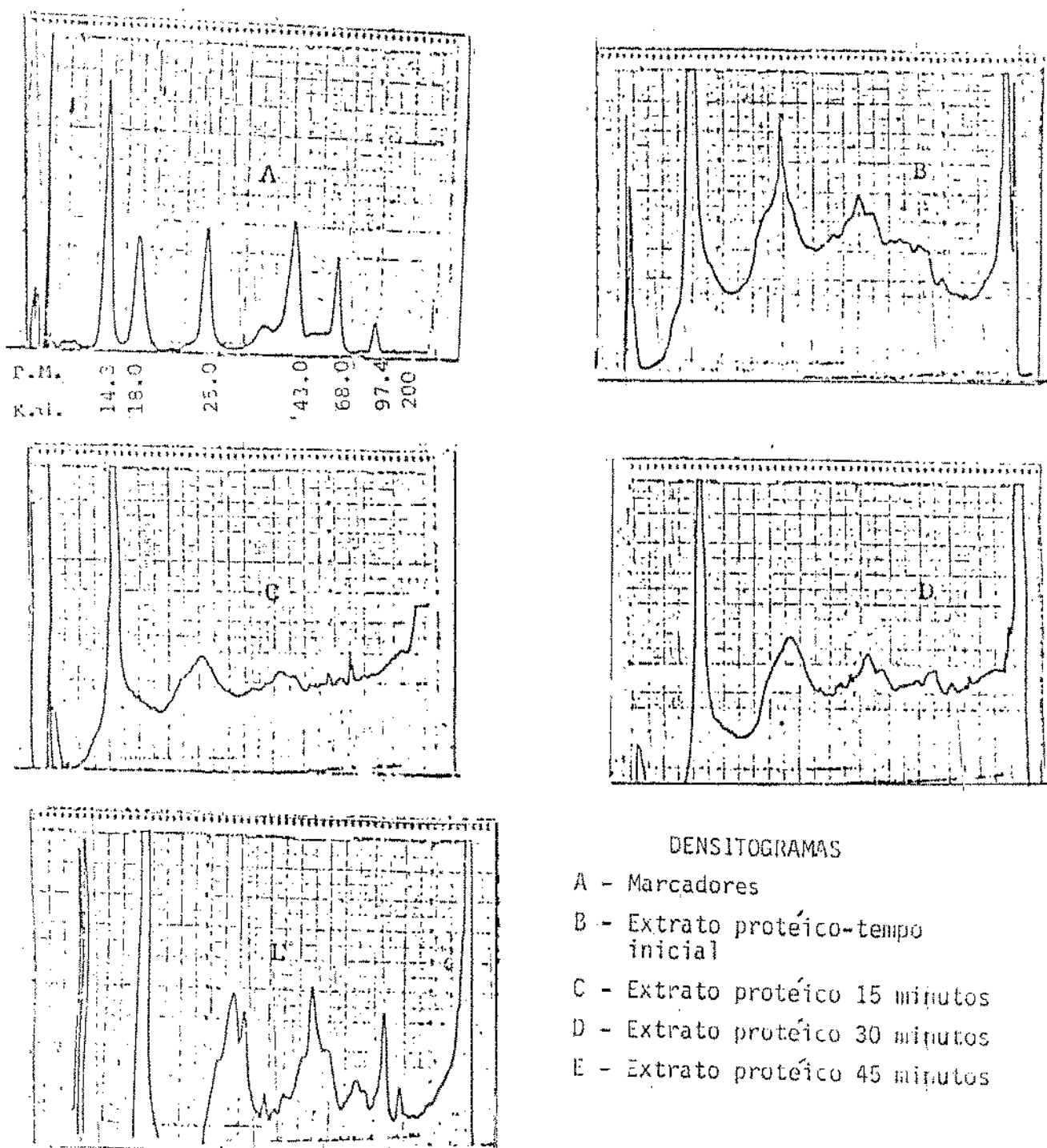


Figura 13 - Densitogramas de zonas eletroforéticas de proteínas do extrato foliar de mandioca durante a ultrafiltração a 50°C.

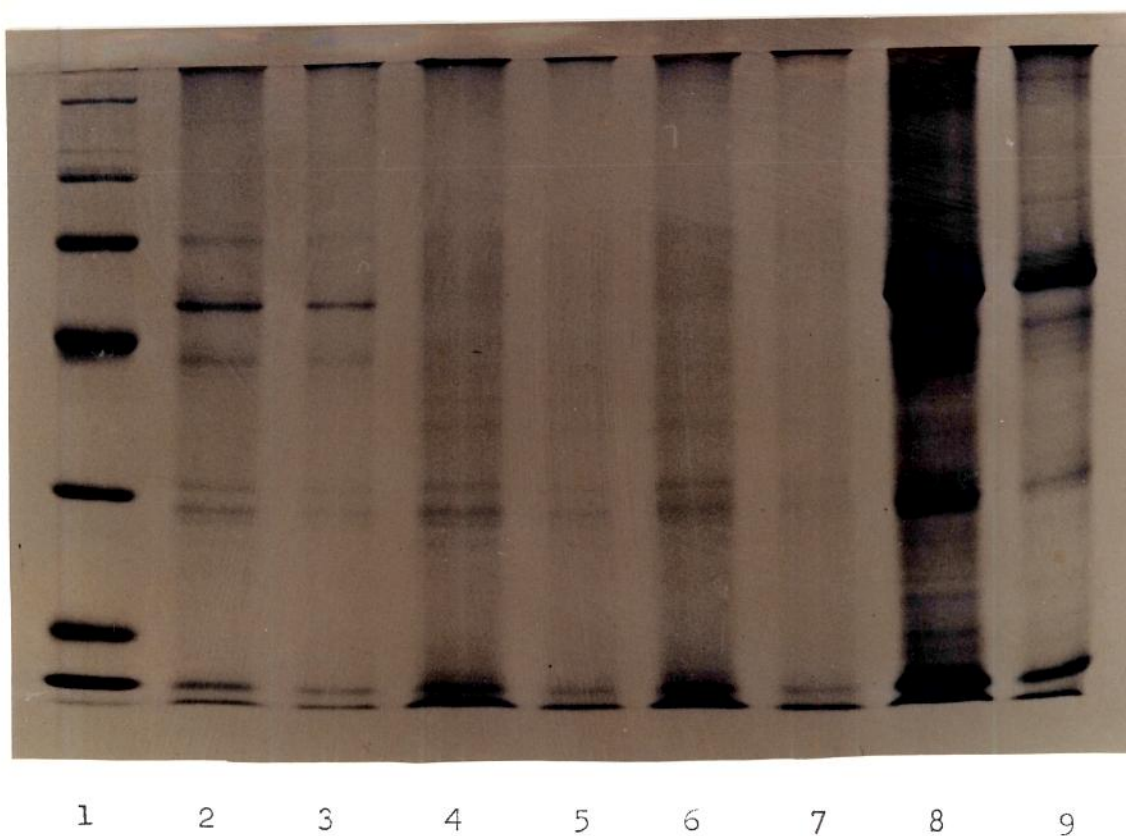
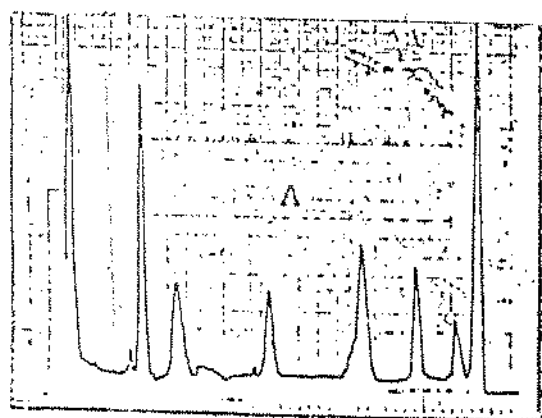


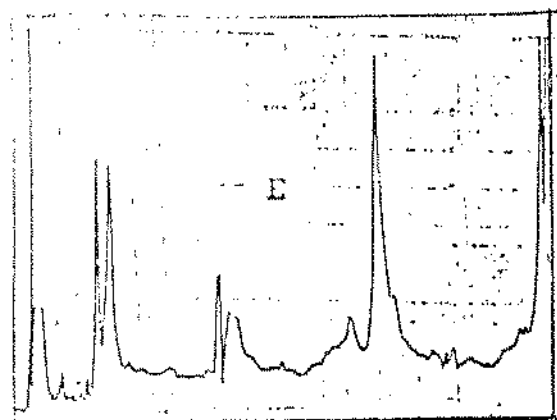
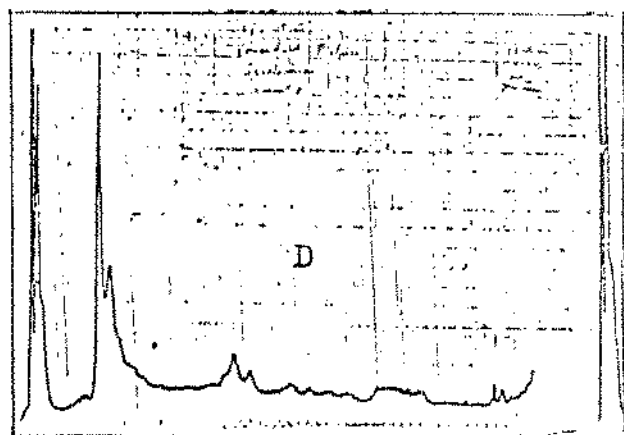
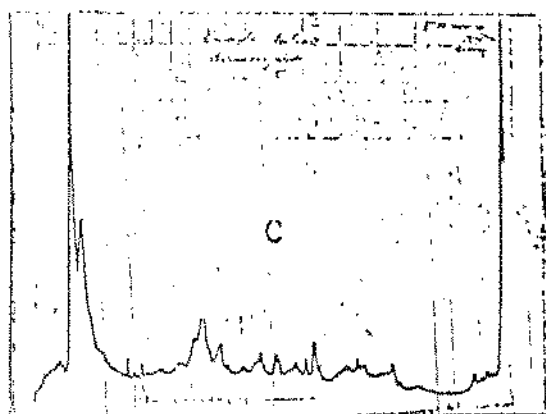
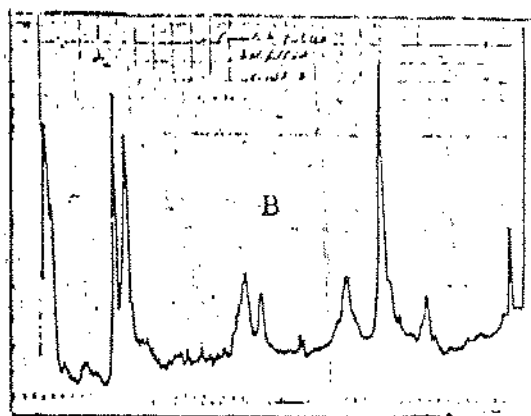
Figura 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio de concentrados protéicos das folhas de mandioca.

Amostras:

- | | |
|---|--|
| 1- Marcadores | 6 e 7- Concentrado protéico (precipitação isoelétrica) |
| 2 e 3- Concentrado protéico (ultrafiltrado) seco por aspersão. | 8 e 9- Proteínas nativas |
| 4 e 5- Concentrado protéico (termocoagulado ácido) seco a 60°C a vácuo. | |



P.M. 14.3 18.0 25.0 43.0 68.0 97.4 200
R.d.



DENSITOGRAFAS

- A- Marcadores
- B- Concentrado (ultrafiltração)
- C- Concentrado (Termocoagulação)
- D- Concentrado Isoelétrico
- E- Proteínas nativas

Figura 15 - Densitogramas de zonas eletroforéticas de proteínas de concentrados protéicos das folhas de mandioca.

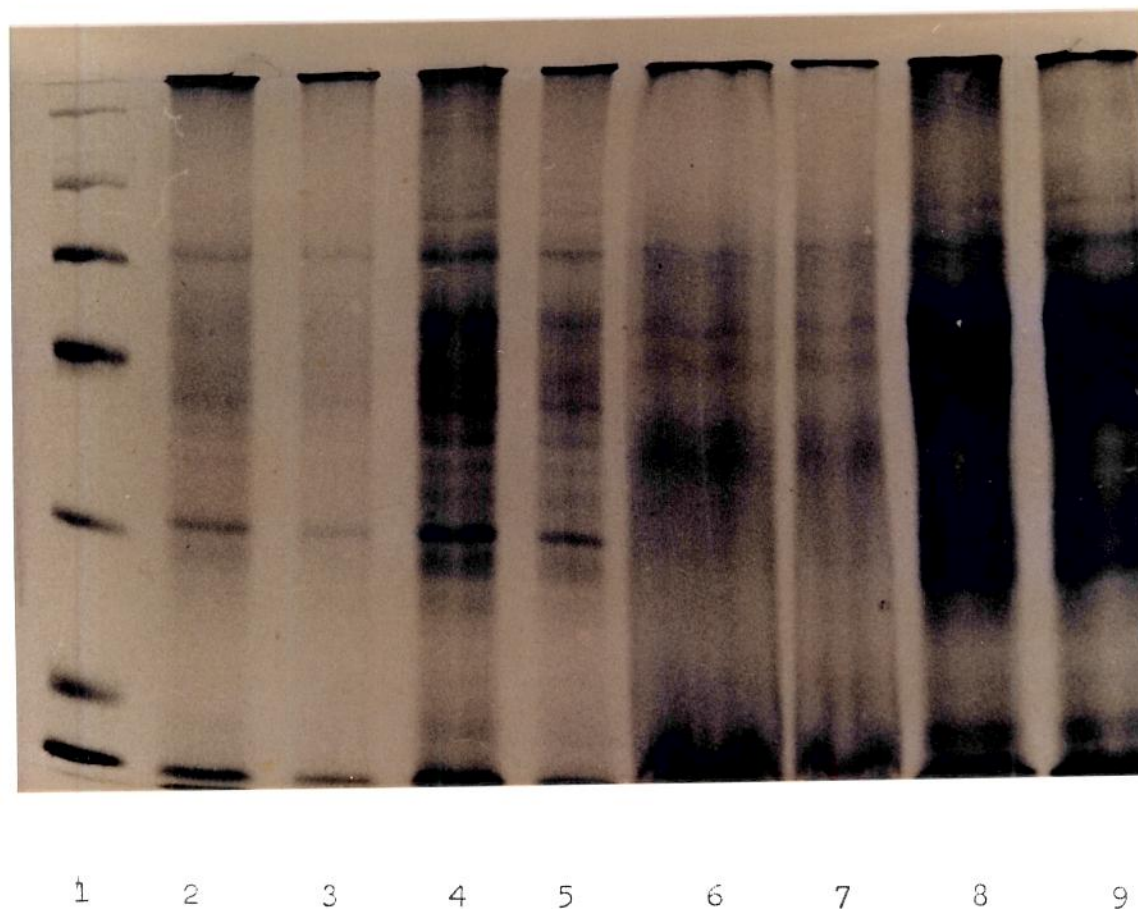


Figura 16 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio de concentrados protéicos liofilizados de folhas de mandioca.

Amostras

- | | |
|---|---|
| 1- Marcadores | 6 e 7- Sobrenadante da termocoagulação. |
| 2 e 3- Concentrado protéico (termocoagulação ácida) | 8 e 9- Concentrado protéico ultrafiltrado |
| 4 e 5- Concentrado protéico (isoeletrico) | |

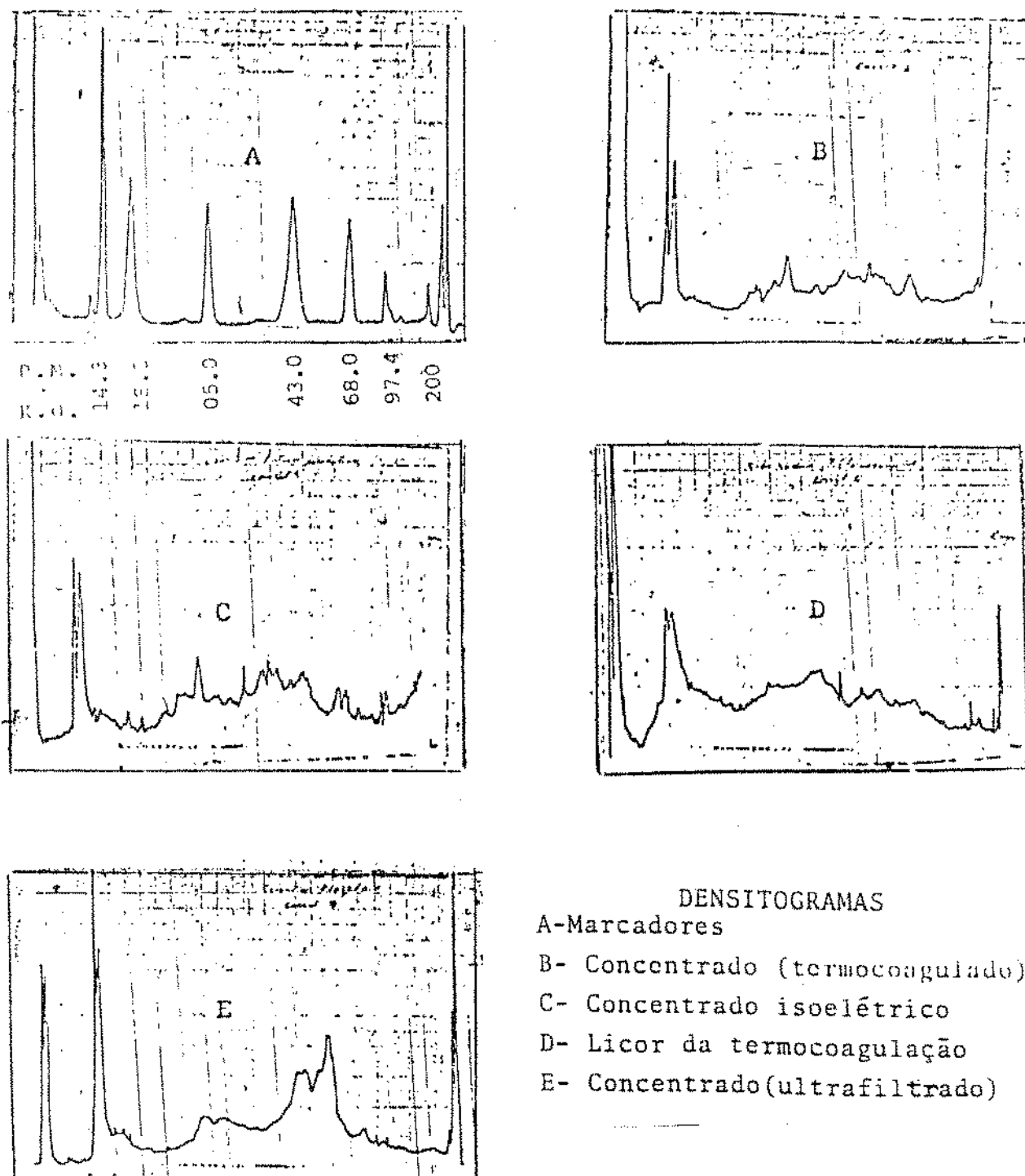


Figura 17 - Densitogramas de zonas eletroforéticas de proteínas de concentrados protéicos e do licor residual da termocoagulação.

hidrolisadas parcialmente pela ação combinada do ácido clorídrico e o calor (85°C) aplicados durante a termocoagulação ácida das proteínas.

O padrão eletroforético do extrato protéico das folhas de mandioca (figura 12), das proteínas nativas (figura 14) e do concentrado ultrafiltrado (figuras 14 e 16) é muito similar a do extrato de proteínas de folhas de mandioca mencionado por MOJARRO (1982), no qual também observa-se frações protéicas de alto peso molecular. No entanto, encontram-se diferenças nos concentrados isoelétricos e termocoagulados do presente trabalho (figuras 14 e 16) com os de MOJARRO (1982) nos quais, ainda que as frações protéicas de alto peso molecular também diminuam na sua concentração relativa nos concentrados protéicos, uma fração de proteínas de alto peso molecular permanece nos concentrados protéicos isoelétrico e termocoagulados.

IV.8- Resolução cromatográfica em sephadex G-200

Na figura 18 mostra-se a resolução cromatográfica das proteínas em estado nativo da folha de mandioca efetuada em sephadex G-200 e usando solução tampão de Tris-glicina (pH 8,8) como eluente. Nesta figura pode-se observar que foi possível separar seis frações protéicas bem definidas com pesos

moleculares perto de 150.000 (banda A) até pesos moleculares de 40.000 (banda F).

Esta resolução cromatográfica concorda com a efetuada por MOJARRO (1982) que encontrou também seis bandas para o extrato de proteínas nativas de folhas de mandioca em Sephadex G-200 e G-50.

Na figura 19 mostra-se a resolução cromatográfica de proteínas solúveis de concentrado protéico obtido por ultrafiltração e na figura 20 a resolução cromatográfica das proteínas do concentrado protéico obtido por termocoagulação ácida. Ambas cromatografias foram feitas em sephadex G-200 usando-se tampão Tris glicina pH 8,8 como eluente.

As proteínas do concentrado protéico ultrafiltrado puderam ser separadas em 5 bandas bem definidas (figura 19) e a do termocoagulado em quatro bandas (figura 20). Ao comparar ambas as resoluções foram encontradas diferenças entre elas, como o é a ausência no concentrado termocoagulado da banda de maior peso molecular perto de (150.000) presente nas proteínas nativas, assim como na mudança de posição das bandas restantes.

A diminuição do número de bandas dos cromatogramas encontrados nos concentrados protéicos foliares, em comparação com a do material original, tem sido também comprovada nos trabalhos de VAN-ZANDER (1974) que usando cromatografia em Bio-Gel P-100, encontrou que as proteínas do concentrado protéico de alfafa apresentam quatro bandas das seis encontradas no material original.

A ausência da banda de alto peso molecular nas proteínas dos concentrados protéicos, que aparece nas proteínas nativas, também foi observada por MOJARRO (1982) para o concentrado de mandioca termocoagulado e para o obtido por precipitação isoelétrica.

A ausência das bandas de alto peso molecular nos concentrados, poderia ser devido a mudanças conformacionais nas proteínas durante o processamento que, não permitiria a solubilização total no tampão ao efetuar a cromatografia. Possivelmente a fração de alto peso molecular, presente na proteína nativa, deve ser a mais afetada na sua solubilidade durante o processamento (extração, coagulação, secagem, etc). Em relação a esta consideração convém fazer referência aos trabalhos de CAMICI e col. (1980), que por cromatografia em sephadex G-50 de suco de alfafa desprovido da fração cloroplástica, encontraram uma banda de alto peso molecular que se identifica como a aldolase e que desaparece em função do tempo a 37°C. Eles correlacionaram o decréscimo desta banda com o grau de proteólise e desnaturação das proteínas do extrato e propõem, a medição de atividade de aldolase, como um parâmetro para predizer rendimentos e estado de desnaturação das proteínas foliares de alfafa.

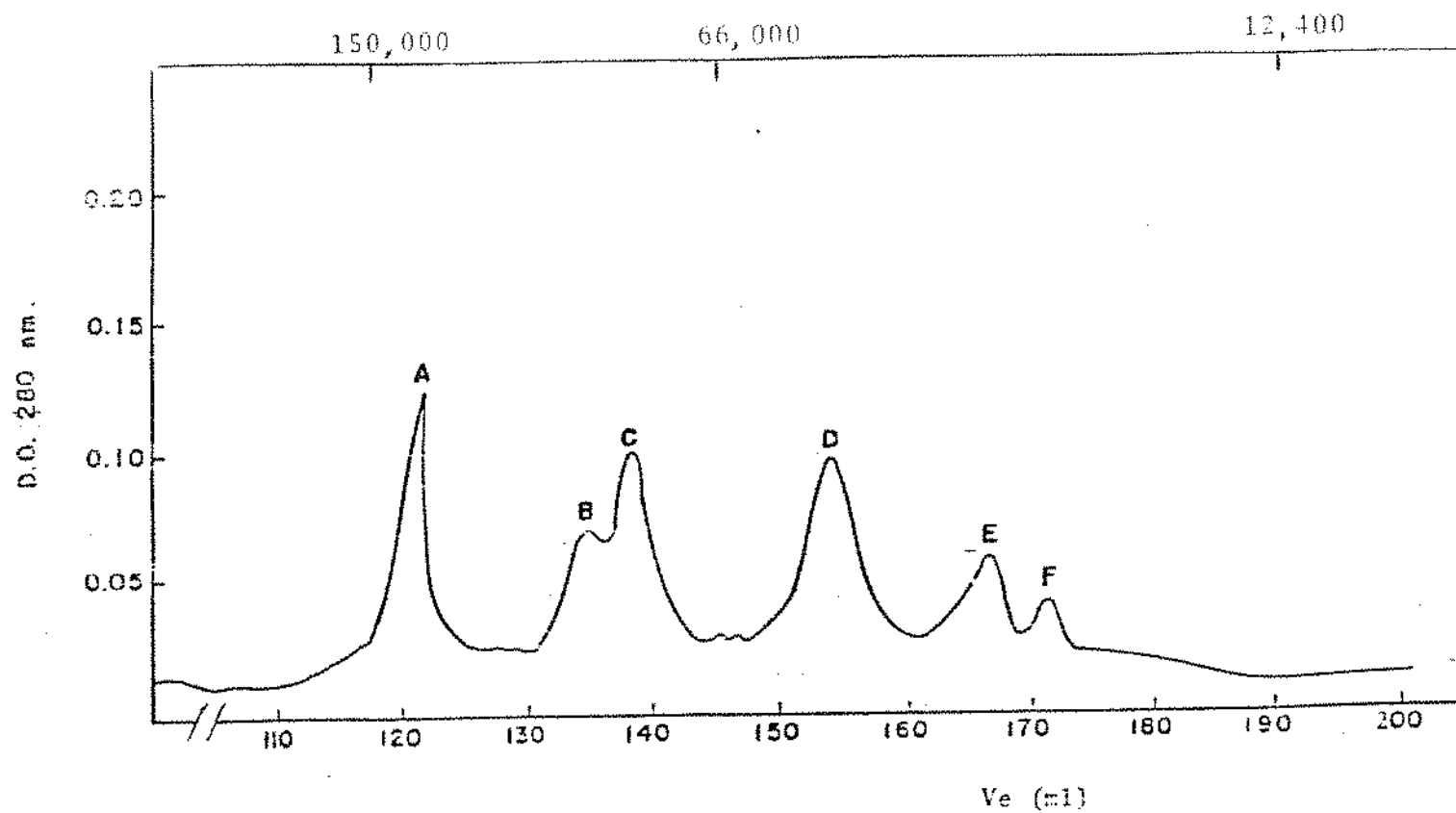


Figura 18 - Cromatografia em coluna sephadex G-200 de proteínas solúveis em estado nativo de folhas de mandioca.

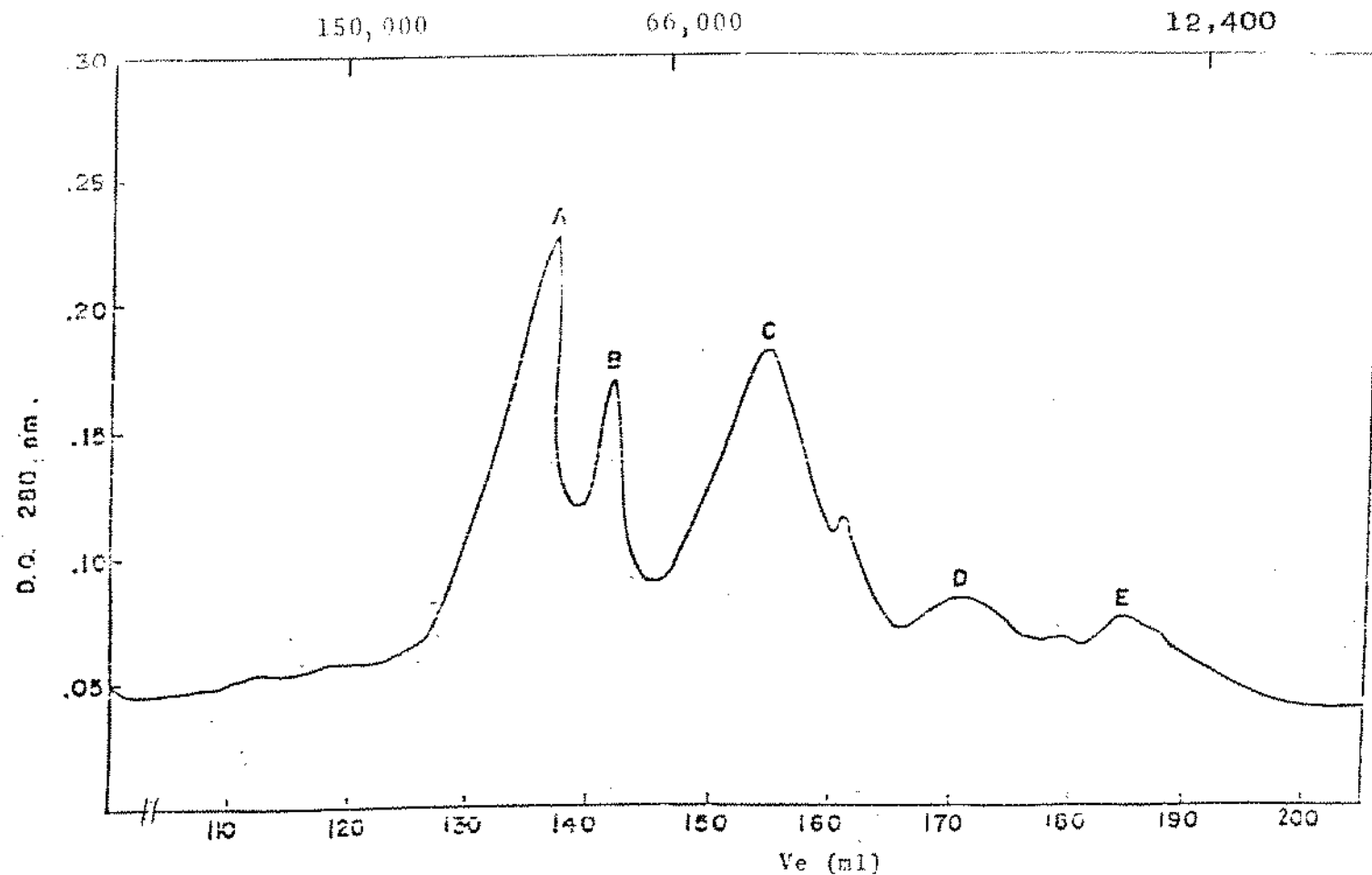


Figura 19 - Cromatografia em coluna sephadex G-200 de proteínas solúveis de concentrado proteico de folha de mandioca obtido por ultrafiltração.

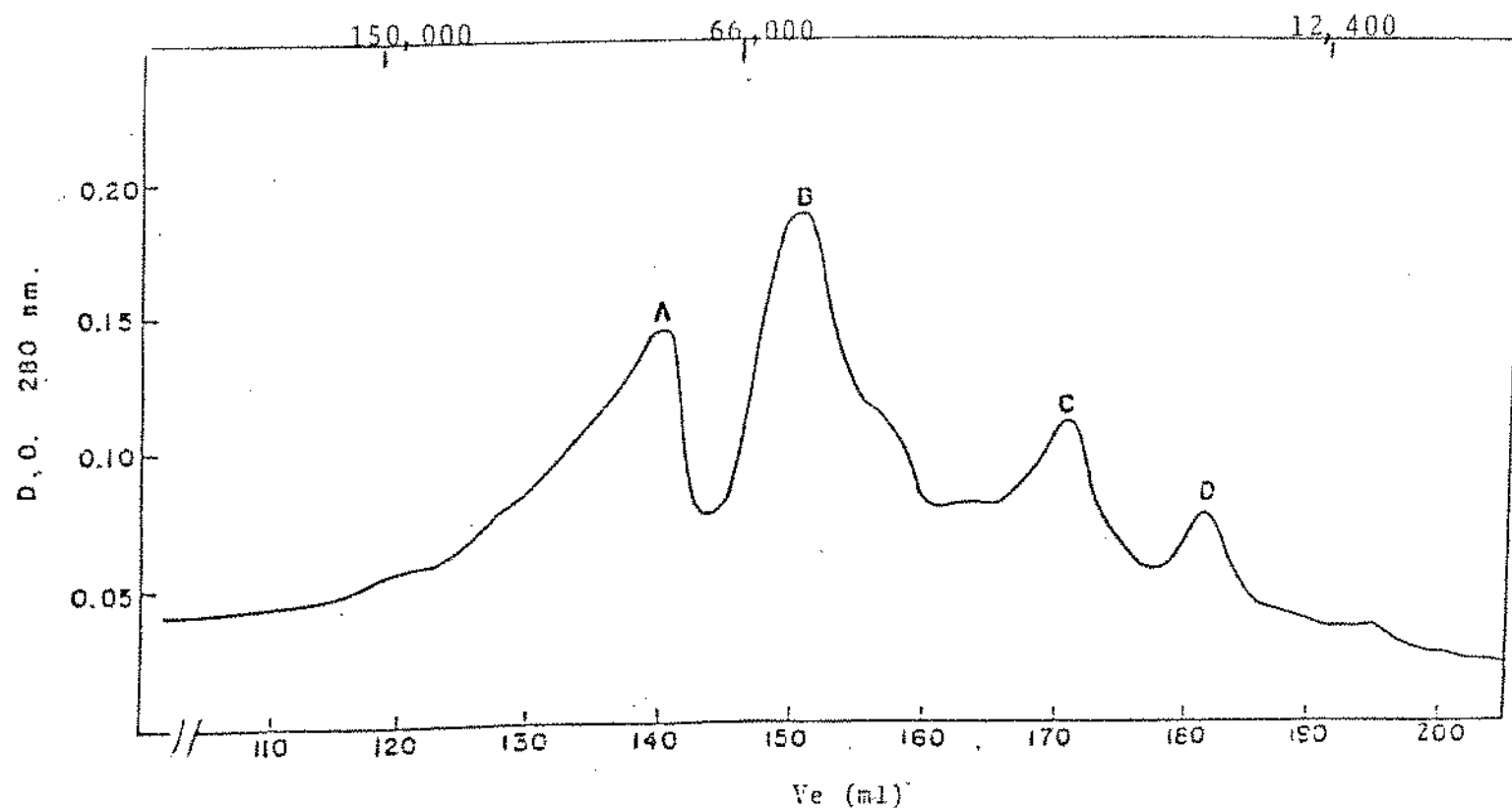


Figura 20 - Cromatografia em coluna sephadex G-200 de proteínas solúveis de concentrado proteico de folha de mandioca obtido por termocoagulação ácida.

IV.9- Classificação das proteínas por solubilidade (classificação de Osborne)

Na tabela XV expressam-se os valores obtidos quando se fracionam as proteínas de acordo com sua solubilidade em diferentes solventes: água, solução de NaCl a 5%, álcool a 70% e solução de NaOH 0,1N. As amostras estudadas foram: concentrado protéico ultrafiltrado, concentrado protéico termocoagulado, ambos secos por aspersão e farinha de folha de mandioca liofilizada.

Os resultados indicam que a fração 1 (solúvel em água) no concentrado ultrafiltrado está em maior concentração que no coagulado. As diferenças existentes entre os dois concentrados podem ser atribuídas ao tratamento térmico ácido, aplicado ao termocoagulado que pode afetar a sua conformação e solubilidade, assim como pela perda de proteínas que não são coaguladas e se eliminam no licor residual durante a filtração. A influência do tratamento das proteínas em relação à distribuição das frações protéicas em base a sua solubilidade, têm sido observada por outros autores. OOMAH e BUSHUK (1983) em estudos sobre caracterização de proteínas, encontrou menor concentração proporcional de albuminas e prolaminas e incremento na concentração de globulinas quando a farinha de lupino é desengordurada.

Em estudos sobre proteínas de gergelim NILO-RIVAS e col. (1981) encontraram marcadas mudanças na concentração

relativa de albuminas, globulinas e glutelinas na farinha de gergelim, em comparação com o isolado protéico obtido por extração alcalina e o isolado obtido por solução salina. A mudança mais notória manifesta-se nas albuminas da farinha de 8,59% a 41% no isolado alcalino. As globulinas de 67,25% na farinha, caíram para 14,8% e 2,48% respectivamente no isolado alcalino e no isolado por solução salina, as glutelinas de 6,90% na farinha, aumentaram para 40,95% no isolado alcalino e 35,20% no isolado por solução salina.

Este significativo incremento das glutelinas nos isolados em relação a farinha original de gergelim observou-se também nos concentrados protéicos foliares em relação a farinha de folha de mandioca.

Alguns autores como HOOD e BRUNNER (1976), tem fracionado proteínas foliares solúveis de alfafa em base a sua solubilidade em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ numa fração insolúvel denominada "Fração G" identificada como globulinas e em outra fração solúvel denominada "Fração A" identificada como albuminas. A proporção das duas frações albuminas e globulinas na alfafa aparece inversa à proporção para folha de mandioca encontrada no presente trabalho. A proporção destas frações nas proteínas vegetais depende da variedade da planta. GUEYASUDDIN e col. (1970) e GUEGUEN e AZANZA (1985) assinalam que as proteínas de girassol apresentam 22 e 56% de albuminas e globulinas respectivamente e que no caso das proteínas de colza, estas mesmas frações encontram-se numa proporção inversa de 48% e 28%.

é também notório que durante os processamentos obtem-se proteínas com características de solubilidade diferentes, já que a fração 4 (solúvel em NaOH) nos dois concentrados protéicos aumentam a sua concentração relativa em comparação com a farinha de folhas liofilizadas.

A diminuição da fração 1 (solúvel em água) nas proteínas do concentrado protéico termocoagulado da folha de mandioca, em comparação com as do material original (farinha de folhas liofilizadas) e o incremento da fração 4 (solúvel em NaOH), também foi observado por MOJARRO (1982).

No presente trabalho, a quantidade de albumina encontrada na folha (24.1%) em relação ao total da proteína presente (22%), concorda na sua relação com a determinada por MOJARRO (1982), que fracionou por solubilidade proteínas de folhas de mandioca da variedade PAN-MEX 51 de 2 diferentes procedências e conteúdos de proteínas de 16% e 23% em base seca, encontrando uma proporção relativa de albuminas de 10,75% e 24,65%, respectivamente.

Tabela XV - Análise por solubilidade (classificação de Osborne) das proteínas de concentrados protéicos das folhas de mandioca, e das proteínas da folha liofilizada (em % da proteína total).

Tratamento	concentrado proteico ultrafiltrado %	concentrado proteico termocoagulado %	folha liofilizada %
Fração 1 (solúvel em água)	19,5	7,5	24,14 (Albuminas)
Fração 2 (solúvel em NaCl)	5,0	5,0	6,76 (Globulinas)
Fração 3 (solúvel em álcool)	6,3	6,5	6,8 (Prolaminas)
Fração 4 (solúvel em NaOH)	65,7	68,3	4,5 (Glutelinas)
Fração 5 (insolúveis)	3,5	12,7	57,8 (Escleroproteínas)

IV.10- Conteúdo de aminoácidos

O conteúdo de aminoácidos no concentrado protéico de folha de mandioca obtido por ultrafiltração e o obtido por termocoagulação ácida e padrão FAO/OMS (1973) estão expressos em gramas de aminoácidos por 100 g de proteína na Tabela XVI.

Ao comparar o conteúdo de aminoácidos das proteínas foliares termocoaguladas com as ultrafiltradas encontram-se diferenças quanto aos valores de lisina e treonina principalmente, que estão em concentrações mais elevadas nas proteínas ultrafiltradas. Isto concorda com os resultados obtidos por OSTROWSKI-MEISSNER (1980) quando compararam as concentrações de aminoácidos de concentrados protéicos de pastagens obtidos por termocoagulação e por ultrafiltração a 25°C. Encontraram maior concentração de lisina, treonina e triptofano no concentrado protéico ultrafiltrado.

OSTROWSKI-MEISSNER (1980) menciona que a composição de aminoácidos dos concentrados protéicos de folhas de plantas não mostram grandes variações, porém a concentração de aminoácidos, particularmente lisina, depende em grande parte do método de separação das proteínas do suco das plantas. Ao comparar as concentrações de aminoácidos dos concentrados protéicos de folha de mandioca com o padrão FAO/OMS (1973) detecta-se que os aminoácidos limitantes são os aminoácidos sulfurados, mesmo assim a concentração de lisina no concentrado

Tabela XVI - Conteúdo de aminoácidos nos concentrados protéicos das folhas de mandioca obtido por ultrafiltração e por termocoagulação e padrão FAO/OMS (1973) em g de aminoácido/100 g de proteína.

Aminoácidos	Concentrado Protéico Obtido por Ultrafiltração	Concentrado Protéico obtido por Termocoagulação	FAO/OMS (1973)
Lisina	5,05	4,90	5,5
Histidina	2,42	2,70	
Arginina	7,50	7,05	
Ác. Aspártico	2,12	6,15	
Treonina	4,15	3,60	4,0
Serina	3,90	4,10	
Ác. Glutâmico	10,35	11,15	
Prolina	4,25	4,50	
Glicina	4,90	3,90	
Alanina	4,30	4,05	
Valina	4,98	4,10	5,0
Cistina	0,55	0,40	3,5
Metionina	1,20	1,00	
Isoleucina	3,90	4,15	4,0
Leucina	7,20	8,30	7,0
Tirosina	3,15	2,95	6,0
Fenilalanina	4,80	4,10	
Triptofano*	0,70	0,55	1,0
Cômputo químico	50,00	40,00	

*Determinado pelo método de LOMBARD e LANGE (1965).

Tabela XVII- Conteúdo de aminoácidos nas sementes de gergelim e farinha desengordurada de gergelim germinado e padrão FAO/OMS (1973) em g de aminoácido/100 g de proteína.

Aminoácidos	Semente de Gergelim	Farinha desen- gordurada de Gergelim Germinado	FAO/OMS (1973)
Lisina	2,35	2,65	5,5
Histidina	2,80	2,58	
Arginina	12,50	10,50	
Ác. Aspártico	7,40	6,24	
Treonina	3,80	2,75	4,0
Serina	4,10	3,82	
Ác. Glutâmico	15,30	14,72	
Prolina	6,15	7,34	
Glicina	4,25	4,84	
Alanina	4,10	3,83	
Valina	4,50	4,36	5,0
Cistina	0,81	0,69	
Metionina	2,48	2,81	3,5
Isoleucina	3,32	3,94	4,0
Leucina	6,80	6,64	7,0
Tirosina	2,50	3,35	
Fenilalanina	4,45	4,15	6,0
Triptofano*	1,30	1,06	1,0
Cômputo químico	42,72	48,00	

*Determinado pelo método de LOMBARD e LANGE (1965).

protéico obtido por ultrafiltração é ligeiramente inferior aos valores estipulados pelo padrão FAO/OMS (1973).

Estes resultados são similares aos mencionados por TUPYNAMBA (1979), YEO e CHEW (1976) e ficam entre as faixas de concentração que menciona BYERS (1971) para a proteína foliar.

Ao comparar a concentração de aminoácidos na farinha de gergelim germinado usada no presente trabalho (Tabela XVII) com o padrão FAO/OMS (1973) aparece a lisina como primeiro aminoácido limitante, depois segue treonina. No entanto, os aminoácidos sulfurados (metionina e cistina), os aromáticos (tirosina e fenilalanina) assim como o triptofano igualam os valores do padrão FAO/OMS (1973). KINSELLA e MOHITE (1985) mencionam que os altos valores de aminoácidos sulfurados que apresenta a semente de gergelim a faz excepcional entre as proteínas vegetais para suplementar metionina e triptofano, eliminando os problemas que se têm quando se suplementa com metionina livre.

IV.11- Diminuição de cianetos nos concentrados protéicos foliares

Com o objetivo de comprovar a ação do meio alcalino a pH 8,0 e a 50°C sobre a liberação do ácido cianídrico, condições que são semelhantes aos que se apresentam durante a ultrafiltração, efetuaram-se determinações de cianetos em

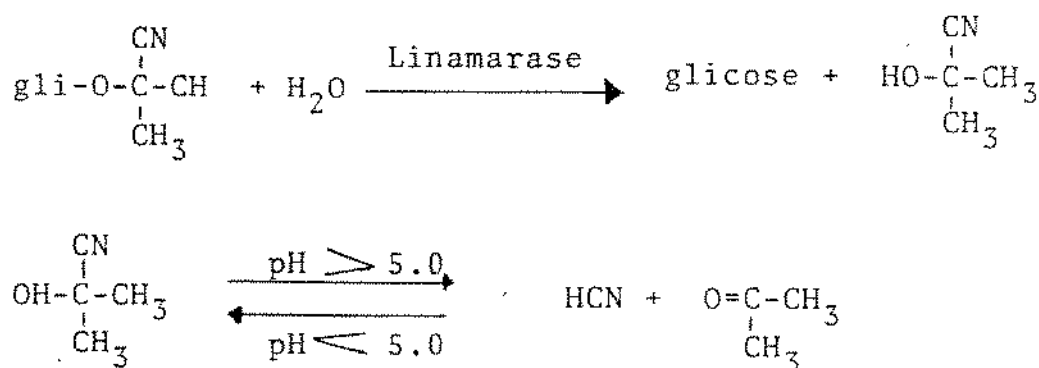
alíquotas tomadas a cada 15 minutos, durante 4 horas num extrato protéico foliar de mandioca nas condições de alcalinidade e temperatura mencionados.

A figura 21 mostra o incremento da concentração de HCN livre no extrato protéico a pH 8,0 submetido a aquecimento a 50°C durante 4 horas e o decréscimo do cianeto combinado.

Como se pode observar a concentração de HCN livre no extrato, incrementa-se notavelmente na primeira hora de tratamento térmico, devido provavelmente a ação do meio alcalino sobre a cianidrina proveniente do glicosídeo por ação da linamarase endógena.

Segundo COOKE (1978) a cianidrina é muito inestável a pH maiores de 5, conforme ilustra a seguinte reação:

Reação Nº 1.



OKE (1984) reporta que a velocidade de liberaração de cianeto depende do tempo de contato da enzima com o glicosídeo, o que poderá ser acelerado pela trituração da raiz e

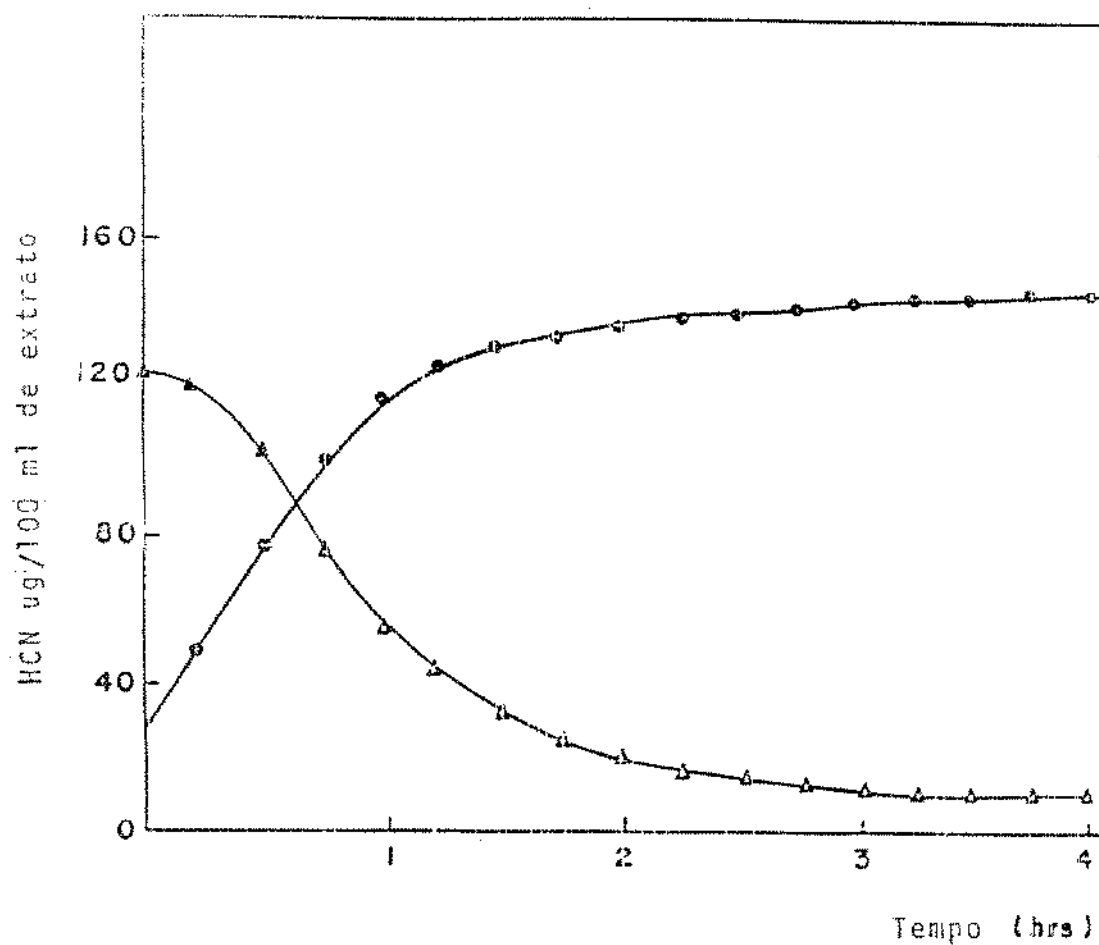


Figura 21 - Mudanças na concentração de HCN livre e combinado no extrato alcalino de proteínas das folhas de mandioca com respeito ao tempo.

● HCN livre

Δ HCN combinado

da folha, a hidrólise pode-se efetuar numa hora. Neste trabalho as condições do extrato de folhas favorece notavelmente o contato das enzimas e o glicosídeo, assim como também o pH alcalino para a liberação do HCN.

As condições da ultrafiltração a pH 8,0 e a 50°C favorece notavelmente a conversão do cianeto combinado (glicosídeo ou cianidrina) a cianeto livre, o qual poderá ser facilmente eliminado pela sua solubilidade em água com a consequente concentração diminuída de cianetos no produto final.

Na Tabela XVIII mencionam-se os valores obtidos nas determinações de cianeto livre e total efetuados na folha fresca e nos concentrados protéicos obtidos por ultrafiltração e no obtido por termocoagulação.

O conteúdo de cianeto total de 375 ppm encontrado no presente trabalho para as folhas é muito superior aos que menciona TORRES (1980) e MOJARRO (1982) de 242 ppm e 250 ppm respectivamente. Isto pode ser explicado levando-se em consideração que nos trabalhos citados, utilizaram-se métodos autolíticos e não métodos com adição de enzimas. Também cabe considerar a grande variabilidade no conteúdo de cianetos nas folhas que pode oscilar entre 100 a 400 ppm no material fresco segundo menciona HAHN (1984). SADIK e col. (1974) citado por HAHN (1984) avaliaram 88,510 brotos de mandioca, usando o método de análise das folhas com picrato e determinaram que somente 92 amostras continham pouco cianeto.

Como se pode observar pelos resultados da Tabela XVIII o conteúdo de cianeto livre e combinado no concentrado

Tabela XVIII - Conteúdo de cianeto livre, combinado e total em folhas da mandioca e em concentrados protéicos obtidos por ultrafiltração e por termocoagulação.

Material	Cianeto livre ppm	Cianeto combinado ppm	Cianeto total ppm
Folha de mandioca fresca	180	195	375
Concentrado pro- téico (ultrafil- tração)	4	8	12
Concentrado pro- téico (termocoa- gulação)	15	30	45

protéico obtido por ultrafiltração é marcadamente inferior ao conteúdo que se apresenta no concentrado protéico obtido por termocoagulação. Ainda quando sejam muito baixos os níveis de cianeto livre e combinado, é de vital importância considerar que os mecanismos de eliminação de tóxicos no organismo aumentam as necessidades de aminoácidos essenciais sulfurados, de acordo com WESTLEY (1981) citado por COOKE (1984). Além disso, convém considerar que um dos produtos de eliminação de tóxicos no organismo é o tiocianeto que inibe a absorção do iodo, segundo afirmam ERMANS e col. (1984), citado por COOKE (1984).

IV.12- Estabilidade dos carotenos

Na Tabela XIX apresentam-se os conteúdos de carotenos totais nas folhas de mandioca fresca, no concentrado protéico obtido por termocoagulação e concentrado protéico obtido por ultrafiltração.

Pode-se observar que o concentrado protéico obtido por ultrafiltração retém uma significativa quantidade de carotenos, cerca de 30% mais que no concentrado protéico obtido por termocoagulação ácida. A maior concentração dos carotenos no concentrado ultrafiltrado pode ser explicado pelo emprego de temperatura mais baixa e pela maior estabilidade que apresentam

os carotenos a pH alcalinos que em meios ácidos, como afirmam DE FREMERY e col. (1972), ARKCOLL e HOLDEN (1973).

O conteúdo de carotenos da folha fresca determinado no presente trabalho de 50,0 mg/kg difere do mencionado por YEOH (1974) citado por MOJARRO (1982) e é similar ao encontrado por TORRES (1980) de 82,0 mg/kg e de 49,7 mg/kg, respectivamente.

Os lipídios peroxidáveis (linoleico e linolênico) em presença de oxigênio molecular e de um catalisador como a lipoxigenase presente na folha, dão produtos de oxidação que por sua vez formaram radicais livres e peróxidos que reagem com sistemas insaturados como no caso dos carotenos, provocando o rompimento da molécula, DOUILLARD (1985). Estas reações de oxidação dos lipídios insaturados se veem favorecidos pelo meio ácido (DE FREMERY e col., 1972).

Durante a obtenção do concentrado termocoagulado é necessário baixar o pH a 4 e posteriormente elevar a temperatura a 85°C, condições que provocam as perdas de carotenos, não sendo assim na ultrafiltração onde prevalece o meio alcalino (pH 8) e temperatura de 50°C o que resulta numa maior retenção de carotenos.

Tabela XIX - Conteúdo de carotenos totais na folha de mandioca, concentrado protéico (ultrafiltração) e concentrado protéico (termocoagulação).

Material	Concentração (p.p.m.)
Folha fresca de mandioca	50
Concentrado protéico (ultrafiltração)	235
Concentrado protéico (termocoagulação)	180

IV.13- Digestibilidade das proteínas dos concentrados protéicos

Na Tabela XX comparam-se os valores obtidos na determinação da digestibilidade "in vitro" para o concentrado protéico obtido por ultrafiltração, concentrado protéico obtido por termocoagulação em meio ácido e caseína usada para fins comparativos. A digestibilidade encontrada foi de 85, 80 e 92% respectivamente.

O incremento da digestibilidade do concentrado ultrafiltrado em comparação com o concentrado termocoagulado pode se atribuir a que durante a ultrafiltração eliminam-se substâncias polifenólicas que afetam significativamente a digestibilidade das proteínas. KNUCKLES e col. (1980a) mencionam que 86% de compostos orto-dihidroxi-fenólicos podem ser eliminados durante a diafiltração de suco clarificado de alfafa. HUMPHRIES (1982) menciona que 1,5% de taninos reduzem a digestibilidade das proteínas de soja de 93 a 73%.

OSTROWSKI-MEISSNER (1980) reporta valores de digestibilidade de concentrado protéico foliar de pastagens de 73% para o obtido por termocoagulação e 78% para o obtido por ultrafiltração.

Para concentrado protéico de folhas de mandioca (por termocoagulação), MOJARRO (1982) menciona um valor de digestibilidade de 87 a 90%; TORRES (1980) menciona 85% e RUIZ (1985) menciona valores de digestibilidade de 34% em concentrado protéico de folha de mandioca obtido por termocoagulação ácida.

Tabela XX - Digestibilidade das proteínas "in vitro" de concentrados protéicos de folha de mandioca.

Fonte protéica	%
Concentrado proteico (termocoagulação)	80
Concentrado proteico (ultrafiltração)	85
Caseína	92

A digestibilidade encontrada de 80 e 85% para os dois tipos de concentrados obtidos no presente trabalho é similar e satisfatória quando comparada com os dados mencionados na literatura para estes tipos de produtos (OSTROWSKI-MESSNER, 1980 e AKESON e STHAMAN, 1965).

IV.14- Níveis de lisina disponível

Na Tabela XXI encontram-se os valores obtidos para lisina disponível para as folhas de mandioca liofilizadas, para o concentrado protéico obtido por termocoagulação e obtido por ultrafiltração determinada pelo método químico de KAKADE e LIENER (1969), na qual pode-se observar que o concentrado termocoagulado contém menores valores de lisina disponível. Isto pode ser atribuído ao tratamento enérgico que sofre a proteína durante a termocoagulação a 85°C no qual o grupo epsilon-amino da lisina reage com açúcares presentes no extrato quente do vegetal, podendo ainda reagir com outros aminoácidos formando uniões proteína-proteína como menciona OSTROWSKI-MEISSNER (1980).

Tabela XXI - Disponibilidade de lisina em proteínas de folhas da mandioca, concentrado protéico (ultrafiltração) e concentrado protéico (termocoagulação).

Fonte protéica	lisina disponível %
<hr/>	
Folhas de mandioca liofilizada	92
Concentrado protéico (ultrafiltração)	90
Concentrado protéico (termocoagulação)	83

IV.15- Quociente de eficiência protéica (PER)

Os quociente de eficiência protéica (PER) para os concentrados protéicos obtidos por ultrafiltração, para o concentrado obtido por termocoagulação e para o controle de caseína expressam-se na Tabela XXII.

Os valores de PER para o concentrado protéico ultrafiltrado e para o termocoagulado de folhas de mandioca foram de 1,81 e 1,60, respectivamente, valores que são inferiores ao obtido por TORRES (1980) que encontrou um valor de 1,95 para o concentrado de folha de mandioca obtido por termocoagulação de outra variedade e procedência à usada neste trabalho. RUIZ (1985) encontrou valores de PER para o concentrado protéico termocoagulado de folhas de mandioca de 1,22 em estudos de suplementação de pastas alimentícias. No entanto, TUPYNAMBA e VIEIRA (1979), encontram valores negativos de PER para o concentrado protéico de folha de mandioca obtido por precipitação isoelétrica e valores muito baixos quando foi suplementado com metionina.

HUMPHRIES (1982) menciona que em provas de alimentação com animais usando concentrados protéicos foliares podem estes ser comparados favoravelmente com outros alimentos e podem ser excelentes suplementos para outras fontes protéicas e proporciona faixas de PER para concentrados protéicos foliares não fracionados de 1,1 a 2,3, para concentrados extraídos com solventes de 1,4 a 2,0 e para a fração citoplasmática de 2,0 a

Tabela XXII - Quociente de eficiência protéica (PER) da caseína, farinha desengordurada de gergelim germinado, concentrados protéicos foliares e misturas.

Fonte protéica	PER	PER (corregido)	% do PER de caseína
Caseína	3,20 \pm 0,023	2,5	100
Farinha desengordurada de gergelim germinado F.D.G.G.	1,93 \pm 0,193	1,50	60,0
Concentrado protéico de folha de mandioca por ultrafiltração (C.P.F.M.U.)	2,31 \pm 0,017	1,81	72,4
Concentrado protéico de folha de mandioca por termocoagulação (C.P.F.M.T.)	2,05 \pm 0,08	1,60	60,0
Mistura de F.D.G.G. - C.P.F.M.U. (47,5 + 52,5%)	2,96 \pm 0,032	2,30	92,0
Mistura de F.D.G.G. - (C.P.F.M.T.) (50 + 50%)	2,40 \pm 0,022	1,90	76,0

2,4. No caso particular das proteínas de folhas de tabaco KUNG e col. (1980) assinalam um PER superior ao da caseína. Os concentrados protéicos de folhas de mandioca obtidos no presente trabalho, apresentam valores de PER entre as faixas mencionadas por HUMPHRIES (1982).

As variações do valor PER encontrado na literatura podem explicar considerando que o valor nutritivo das proteínas dos concentrados, pode estar influenciado por alguns fatores intrínsecos como o são a espécie e variedade das plantas, a origem celular das proteínas, a idade e por fatores extrínsecos, entre os quais figuram principalmente os tratamentos tecnológicos, a presença de substâncias redutoras no solvente, e o método de secagem.

ALLISON (1971) menciona que a adição de metabissulfito de sódio no material foliar incrementa a disponibilidade da lisina de 90,5 para 93,5% melhorando o PER assim como a cor do concentrado.

O método de secagem influi significativamente no valor nutritivo dos concentrados protéicos foliares. WOODHAN (1971) menciona variações do valor nutritivo de concentrados quando são secos na estufa a 100°C, por liofilização, por solventes (acetona) e posteriormente a vácuo. SAUVANT (1981) apresenta também variações de valor nutritivo das proteínas foliares do trigo secos a 100°C e por liofilização.

No presente trabalho usou-se a secagem por aspersão e devido a rapidez do processo não ocorreram reações indesejáveis que provocam uma diminuição no valor nutritivo das proteínas.

IV.16- Germinação do gergelim

Nas Tabelas XXIII e XXIV e XXV pode-se apreciar a composição da semente de gergelim variedade "Instituto" utilizada no presente trabalho, assim como a composição da semente germinada e da farinha da semente germinada descascada e desengordurada.

A composição da semente de gergelim varia de acordo com a variedade e procedência como o confirmam os trabalhos de SHAMANTHAKA e col. (1974), EL TINAY e col. (1976), JOHNSON (1970), CALDWELL (1958), OKUBO e col. (1979), JOHNSON e col. (1979), nos quais pode-se observar que o conteúdo de gordura oscila numa faixa de 45-63% e o conteúdo de proteína de 18-31%. A variedade "Instituto" de procedência de Apatzingán, Michoacán, México, utilizada neste estudo mostra uma composição compreendida entre as faixas mencionadas na literatura.

A composição porcentual da semente não varia significativamente com a germinação depois de 96 horas, podendo no entanto, observar-se um ligeiro incremento dos lipídios e

carboidratos e uma ligeira diminuição no conteúdo de proteínas e fibra. As variações da composição das sementes durante a germinação depende de muitos fatores, a literatura cita exemplos desta variabilidade, como os publicados por BEWLEY e BLACK (1978), no entanto, muitas mudanças bioquímicas podem ocorrer, as quais não são detectáveis nas determinações que expressam a composição percentual aproximada.

Na mesma Tabela XXV que se mostra a composição da farinha desengordurada, pode-se observar o acentuado aumento de porcentagem de todos os constituintes ao ser eliminada a gordura e cuja composição percentual é similar à das farinhas desengorduradas de gergelim da indústria (ARJONA, 1984).

As interações dos produtos de oxidação de lípidios insaturados com proteínas e carotenos e os efeitos que as ocasionam, com a consequente diminuição do valor nutritivo, tem sido amplamente elucidado por alguns autores, entre eles DOUILLARD (1981), HUDSON e KARIS (1976), ARKCOLL (1973) e HUDSON e KARIS (1973).

Com a finalidade de se evitar as reações que afetam as proteínas e carotenos do concentrado protéico foliar por ação dos lípidios insaturados, optou-se por desengordurar a farinha de gergelim germinado para ser usado nas provas biológicas.

Tabela XXIII - Análise percentual de semente de gergelin variedade "Instituto".

Determinação	Base úmida %	Base seca %
Umidade	9,00	---
Proteína	16,03	17,62
Extrato etéreo	50,45	55,44
Fibra crua	4,38	4,82
Cinzas	4,77	5,25
Carboidratos	15,37	16,87

Tabela XXIV - Análise percentual de Gergelim Germinado (96 horas).

	Base úmida %	Base seca %
Umidade	8,30	----
Proteína	14,85	16,19
Cinzas	4,50	4,91
Extrato etéreo	52,12	56,84
Fibra crua	3,50	3,81
Carboidratos	16,73	18,25

Tabela XXV - Análise porcentual da farinha desengordurada de gergelin germinado (96 horas) e descascada.

Determinação	Base úmida %	Base seca %
Umidade	3,35	---
Proteína	40,81	42,22
Gordura	2,87	2,97
Fibra crua	7,55	7,81
Cinzas	1,25	1,60
Carboidratos	44,07	45,71

IV.16.1- Diminuição do conteúdo de fitatos

Na Tabela XXVI apresenta-se o conteúdo de ácido fítico na semente de gergelim original, semente de gergelim descascado, semente de gergelim germinado e semente de gergelim germinado e descascado; pelos resultados obtidos pode-se deduzir que o descascado por si mesmo não influi na diminuição do ácido fítico, mas no entanto a germinação influi favoravelmente na diminuição do ácido fítico e se elimina ainda mais pela lavagem durante o descascamento, o qual se efetua por imersão numa solução de NaOH a 3% e temperatura de 40°C.

A presença de fitatos na semente de gergelim e seus produtos é de grande significado nas propriedades funcionais e nutritivas deste alimento, pela facilidade que apresenta o ácido fítico de poder se ligar a minerais essenciais da dieta, diminuindo grandemente a biodisponibilidade, principalmente do zinco, ERDMAN (1979), FORBES e PARKER (1977), do cálcio FORBES (1964), NELSON e col. (1968), MAGA (1982); do ferro por DAVIS e NAGTINGALE (1975), COWAN e col., (1966), WELCH e VAN CAMPEN (1975). ERDMAN (1979) afirma que minerais, tais como o cobre, manganês, molibdênio e cobalto são também afetados por fitatos de sementes de oleaginosas.

Tem-se proposto numerosos métodos para reduzir os níveis de fitatos nos produtos de sementes de oleaginosas, tais como a elaboração de isolados protéicos, por combinação de diálises e resinas de intercâmbio iônico, por ação da fitase a

Tabela XXVI - Conteúdo em ácido fítico em semente de gergelim, gergelim descascado, gergelim germinado (96 h) e gergelim germinado e descascado.

Material

%

Semente de gergelim

6,80

Gergelim descascado

6,10

Gergelim germinado

4,18

Gergelim germinado e descascado

1,85

pH 5,0 - 5,5 e incubação a 65°C, também tratamentos com cloreto de cálcio e ácido seguido de centrifugação, etc. (MAGA, 1982).

Tem-se estabelecido que o ácido fítico é a maior reserva de fosfato em muitas sementes e durante a germinação transfere-se o fosfato do ácido fítico ao ADP para produzir ATP (BEWLEY e BLACK, 1978). REDDY e col. (1982) mostraram interessantes dados referentes a redução até de 50% dos níveis do ácido fítico durante a germinação do feijão "Black gram" (Phaseolus mungo).

IV.17- Cômputo químico das proteínas

O cômputo químico das proteínas dos produtos estudados em base ao aminoácido limitante, estão expressos nas Tabela XVI e XVII. A farinha desengordurada de gergelim obteve um cômputo químico de 48 (em base de lisina) e os concentrados protéicos foliares por ultrafiltração e por termocoagulação deu um cômputo químico de 52 e 40 respectivamente (em base aos aminoácidos sulfurados). Com este índice pode-se predizer, de uma maneira aproximada o valor biológico das proteínas, já que segundo os estudos de BENDER (1973) quando se trata de proteínas de valor biológico de 0,5 a 1,0 estes estariam correlacionados com o cômputo químico.

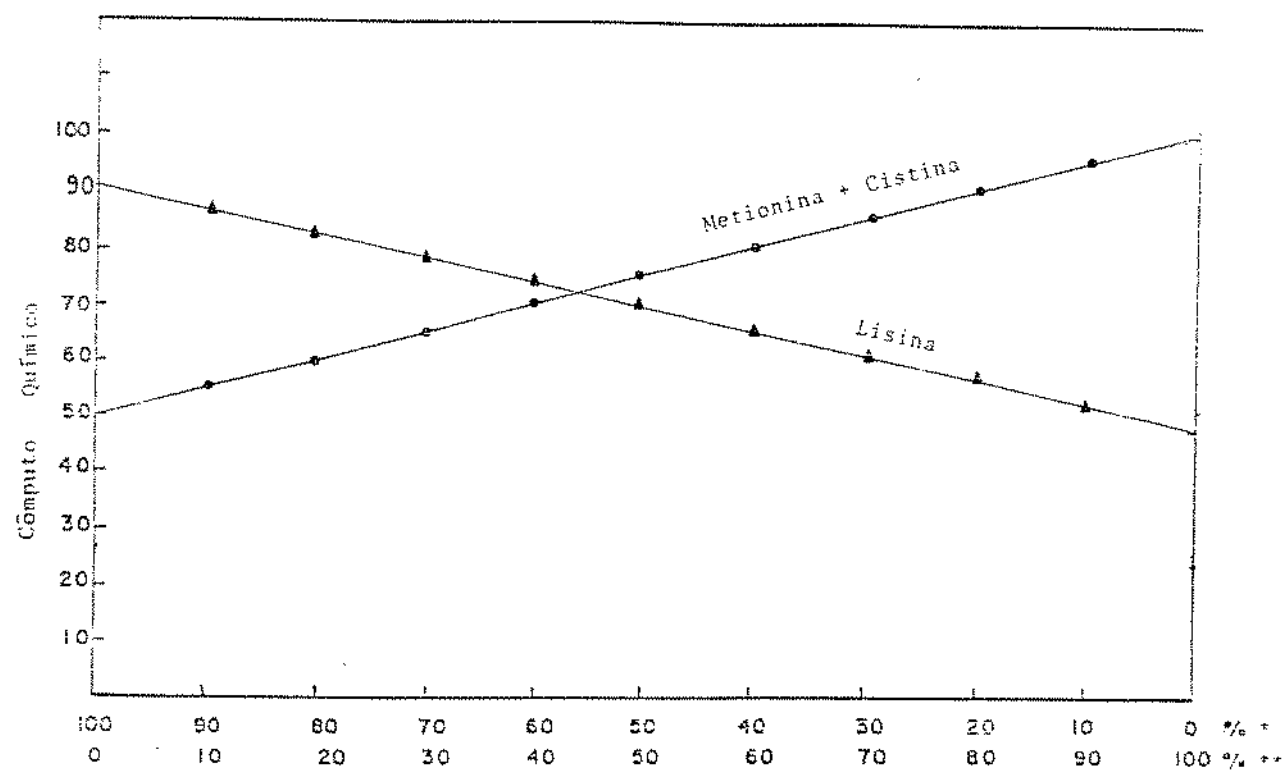


Figura 22 - Cômputo químico das proteínas de misturas em diferentes proporções de concentrado protéico foliar de mandioca (por ultrafiltração)* e farinha desengordurada de gergelim,** em relação a lisina e metionina + cistina.

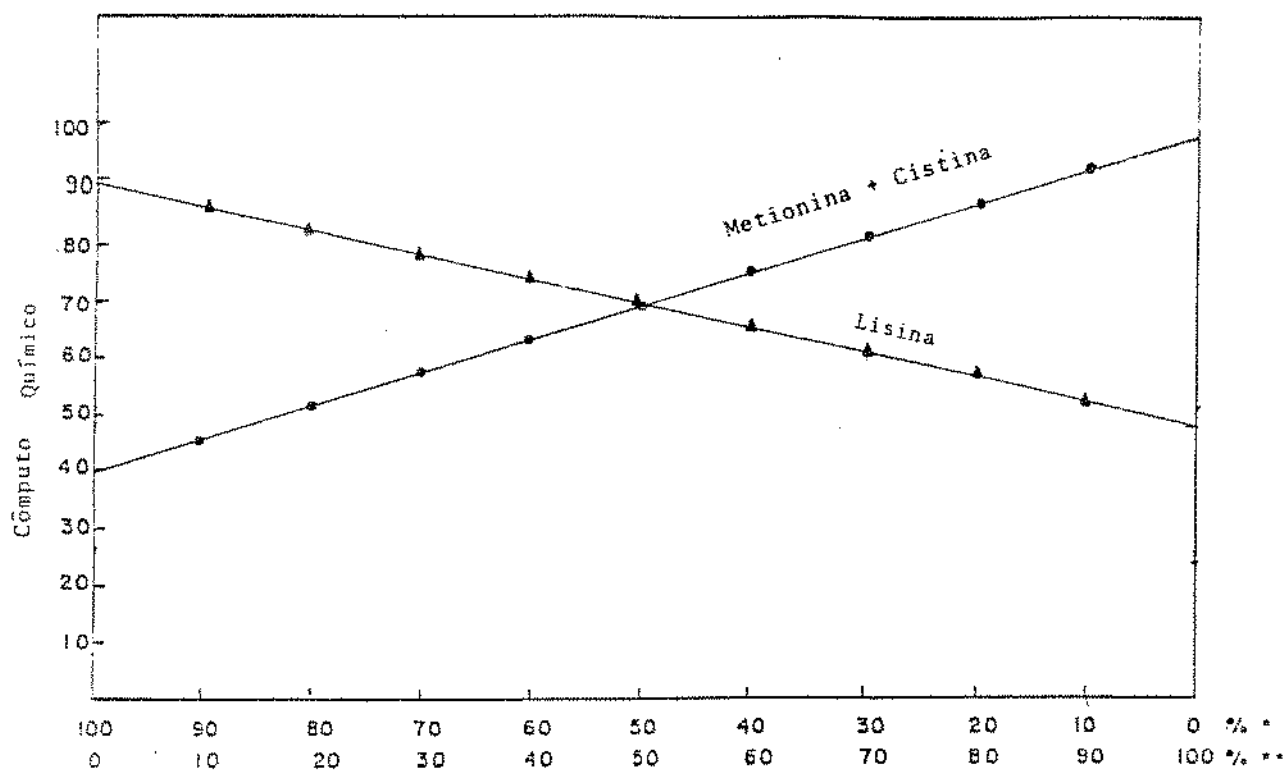


Figura 23 - Cômputo químico das proteínas de misturas em diferentes proporções de concentrado proteico foliar de mandioca (por termocoagulação) * e farinha desengordurada de gergelim, em relação a lisina e metionina + cistina.

Em base ao cálculo do cômputo químico de diferentes proporções de proteínas de concentrados protéicos foliares e de farinha de gergelim germinado calculou-se a mistura ótima, cujo conteúdo em lisina e metionina resultante é o mais próximo do valor recomendado pela FAO/OMS (1973) como se expõe nas figuras 22 e 23.

IV.18- Complementação de proteínas de folhas com proteínas de gergelim

Na Tabela XXII expressam-se também os valores de PER para a farinha desengordurada de gergelim germinado e suas misturas com concentrado protéico foliar de mandioca obtido por termocoagulação e com concentrado protéico obtido por ultrafiltração. Nas figuras 24 e 25 representam-se o promédio de ganho de peso por grupo de 6 ratos durante o período da prova.

O valor de PER para a farinha desengordurada de gergelim germinado de 1,5, foi inferior ao mencionado por KINSELLA e MOHITE (1985) para semente "in natura" de 1,86, mas superior ao das pastas desengorduradas da indústria que dá um valor de PER de 0,9. (ARJONA, 1984).

Os resultados obtidos (Tabela XXII e figuras 24 e 25) indicam que é muito significativa a influência da complementação de ambas as proteínas, o que repercute na elevação do valor PER das misturas protéicas do concentrado

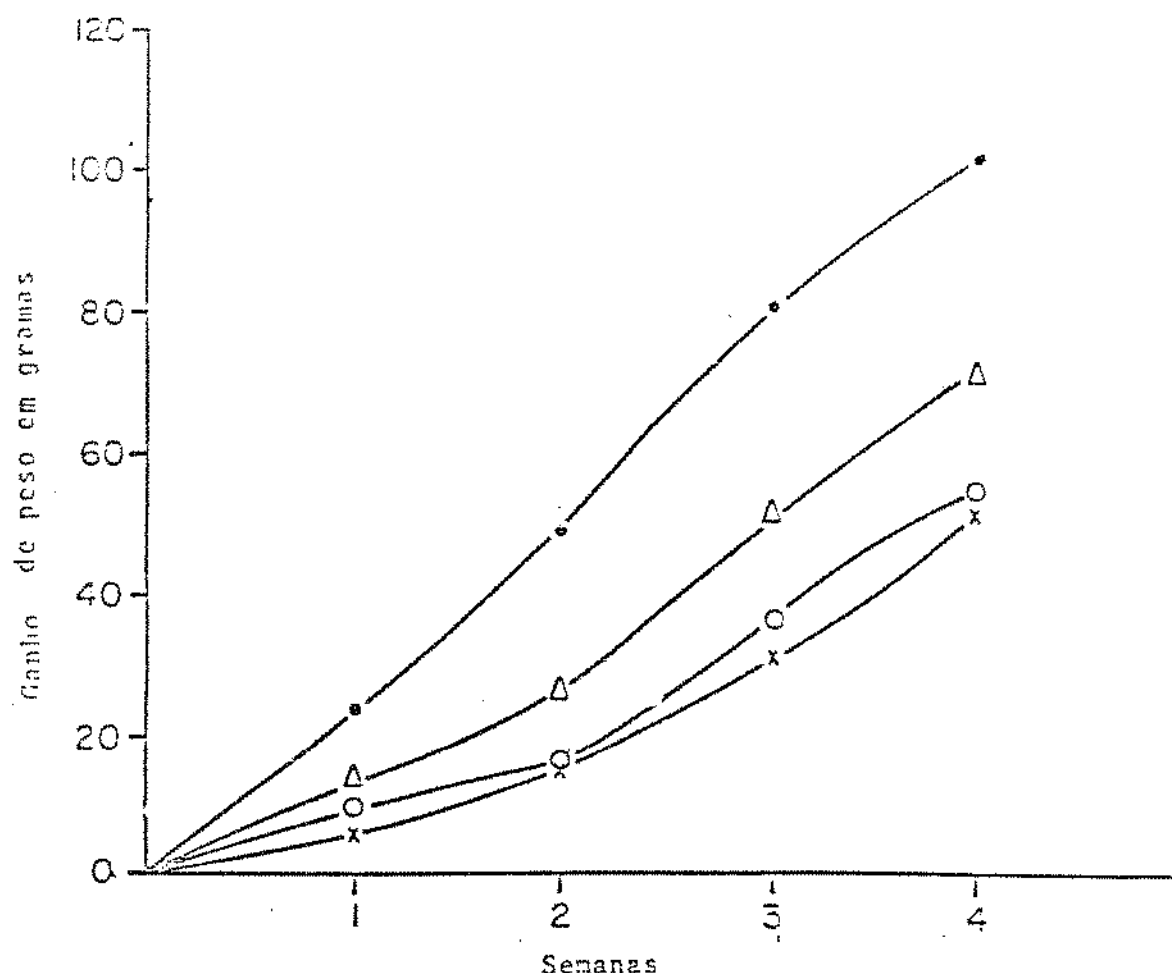


Figura 24 - Ganho de peso de ratos Wistar (promédio de 6) alimentados com caseína (●), C.P.F.M.U. (x), F.D.G.G. (o), e mistura de 57.5% de proteína de C.P.F.M.U. - 42.5% de proteína de F.D.G.G. (Δ).

C.P.F.M.U. = Concentrado protéico foliar de mandioca (ultrafiltrado)

F.D.G.G. = Farinha desengordurada de gergelim germinado.

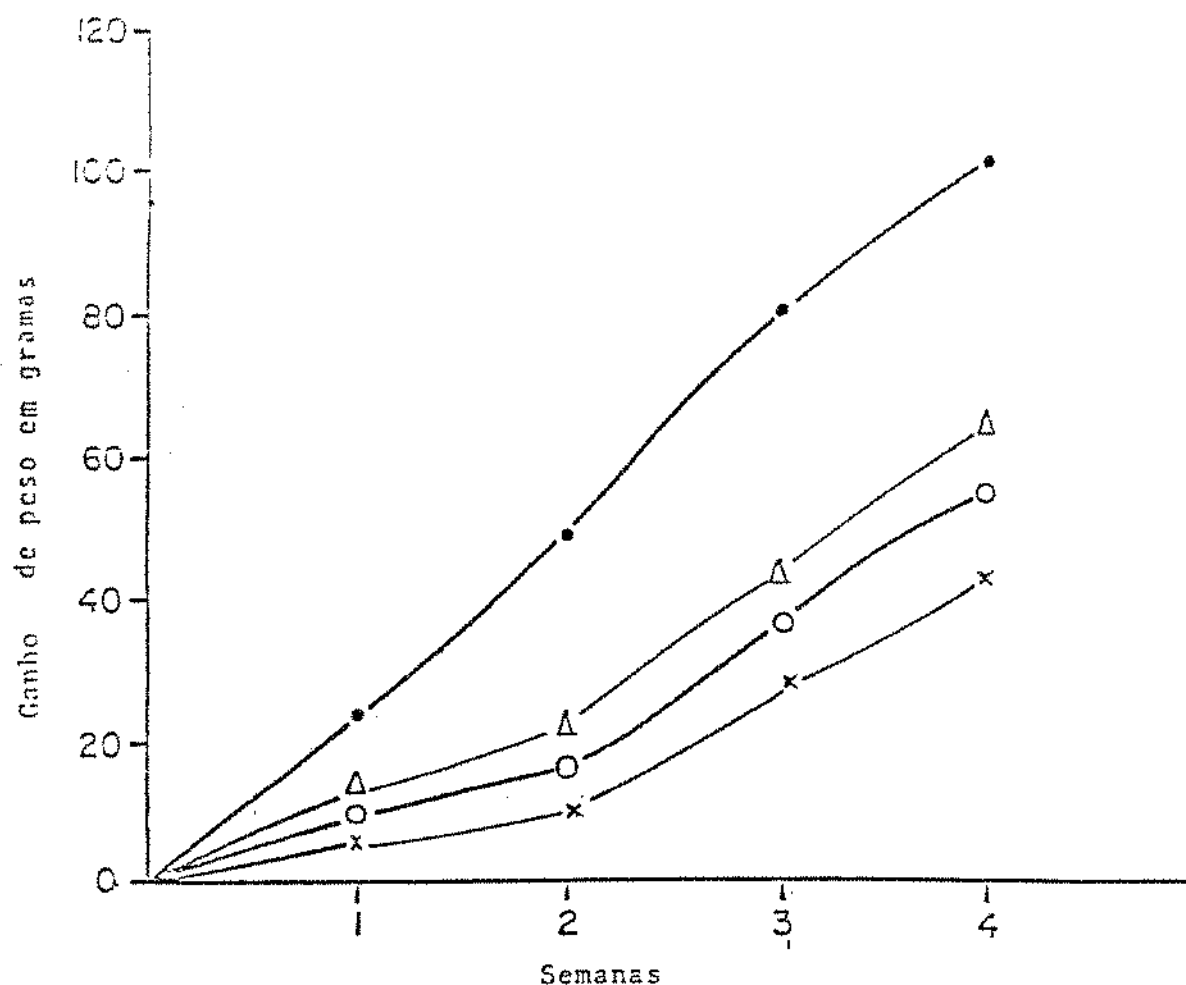


Figura 25 - Ganho de peso de ratos Wistar (promédio de 6) alimentados com caseína (●), C.P.F.M.T. (X), F.D.G.G. (o) e mistura de 50.0% de proteína de C.P.F.M.T. + 50.0% de proteína de F.D.G.G. (Δ)

C.P.F.M.U. = Concentrado Protéico Foliar de Mandioca (termocoagulado).

F.D.G.G. = Farinha Desengordurada de Gergelim Germinado.

ultrafiltrado para 2,30 e do concentrado termocoagulado para 1,90, os quais são significativamente superiores aos valores encontrados de 1,81 e 1,60, respectivamente, e da farinha de gergelim germinado de 1,50.

A eficiência suplementar do gergelim foi verificada em trabalhos anteriores. BRITO e NUNEZ (1982) encontraram muito bons resultados em estudos de complementação de proteínas de gergelim-soja e milho. NIELSEN e col. (1983) obtiveram resultados muito notórios ao complementar 2 proteínas de baixa qualidade: farinha de gergelim de pasta industrial com PER de 0,5 e feijão preto com PER de 0,35 que ao ser misturados em proporção de 50 - 50% obteve-se um PER de 1,78.

A suplementação de proteínas foliares com aminoácidos livres tem sido estudada por muitos autores, entre eles WOODHAN (1971) que apresenta dados de incremento nutritivo das proteínas quando são suplementadas com metionina a diferentes níveis de proteína na dieta. No entanto, a suplementação com metionina e lisina resultaram em valores inferiores de PER; porém, HUMPHRIES (1982) menciona que suplementando proteína foliar com 0.4% de metionina obtem-se um melhor PER e a suplementação com metionina e lisina resulta em valores de PER tão altos quanto a caseína.

A suplementação com metionina de uma proteína que se destine à alimentação humana tem sérios inconvenientes como o sabor resultante, o risco de toxidez e a instabilidade da metionina. Por estas razões se pensou na conveniência de efetuar a suplementação com uma proteína de considerável conteúdo em

metionina e por sua vez a proteína foliar suplementa com lisina a proteína de gergelim

Estudos anteriores tem demonstrado a eficácia das misturas de proteína foliar com outras proteínas com fins suplementares. WOODHAN (1971) menciona os efeitos positivos da suplementação de arroz-proteína foliar, trigo-proteína foliar, leite-proteína foliar e milho-proteína foliar. EGGUM (1970) encontrou resultados muito satisfatórios em trabalhos de suplementação com misturas de 50% de proteína foliar de mandioca e 50% de bacalhau seco.

IV.19- Propriedades funcionais dos concentrados protéicos foliares

IV.19.1- Absorção de água

Na figura 26 apresentam-se os valores obtidos de capacidade de absorção de água de concentrados protéicos de folha de mandioca obtido por ultrafiltração e por termocoagulação e concentrado protéico de soja, expressos em gramas de água por grama de proteína.

A capacidade de absorção de água encontrada para o concentrado protéico de mandioca ultrafiltrado, se apresenta ligeiramente superior ao obtido por termocoagulação e significativamente superior a do concentrado protéico de soja. O

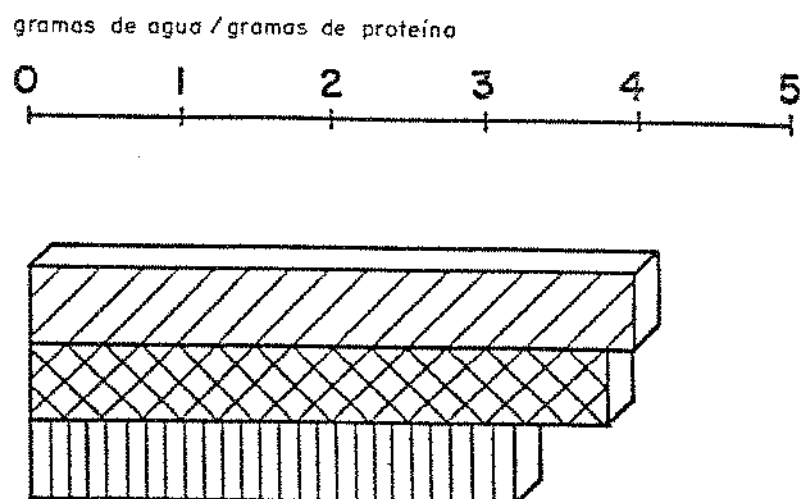





Figura 26 - Capacidade de absorção de água.

-  Concentrado protéico foliar de mandioca obtido por ultrafiltração.
-  Concentrado protéico foliar de mandioca obtido por termocoagulação.
-  Concentrado protéico de soja.

valor de capacidade de absorção de água encontrado no presente trabalho para o concentrado protéico ultrafiltrado foi de quatro gramas de água por grama de proteína, valor que resulta inferior ao mencionado por TORRES (1980) para o concentrado termocoagulado que foi de 4,73.

A ausência de metodologia padronizada para a determinação de propriedades funcionais faz com que sejam os valores pouco reais, no entanto a comparação com uma proteína de referência dá um melhor critério a este respeito.

SHIDAR e col. (1984) mencionam que os aminoácidos polares são os locais primários de interação água-proteína e que a análise de aminoácidos poderia proporcionar o número de grupos polares na molécula protéica, mas esses mesmos autores afirmam que nem todos esses locais podem estar disponíveis para essa interação devido a configuração e impedimento estérico.

CHOU e MORR (1979) determinaram a capacidade de ligar água de cada aminoácido num polipeptídeo sintético e a maior capacidade apresenta-se nos resíduos de aminoácidos polares ionizáveis como o são o ácido aspártico, glutâmico, tirosina, arginina, histidina e lisina.

IV.19.2- Absorção de gordura

Na figura 27 encontram-se os valores obtidos na determinação da capacidade de absorção de gordura dos concentrados protéicos (obtidos por ultrafiltração e por

termocoagulação) e do concentrado protéico de soja; expressos em gramas de óleo por grama de proteína.

A capacidade de absorção de gordura do concentrado protéico ultrafiltrado de 4,9, foi menor que o do concentrado protéico termocoagulado de 6,1. No entanto ambos os concentrados apresentaram valores significativamente superiores ao concentrado protéico de soja, com um valor de retenção de gordura de 1,7.

O valor obtido para o concentrado protéico de folha de mandioca obtido por termocoagulação utilizado no presente estudo é comparável ao obtido por TORRES (1980) para este tipo de concentrado. Assim mesmo, os concentrados protéicos de mandioca ultrafiltrado e termocoagulado apresentaram uma capacidade de absorção de gordura similar aos encontrados por SANCHEZ e LIMON (1987) para os concentrados de alfafa e chaya (Cnidoscolus chayamansa) secos por liofilização.

A excelente capacidade de absorver gordura apresentada por estes concentrados é uma importante característica funcional, já que a facilidade das proteínas de interagir com lipídios, permitiria sua utilização adequada na formulação e processamento de alimentos onde está envolvida a formação de emulsão e retenção de gorduras, como em carnes, e consequentemente retenção de sabores, nutrientes lipossolúveis, volume e suculência da carne durante o cozimento e fritura.

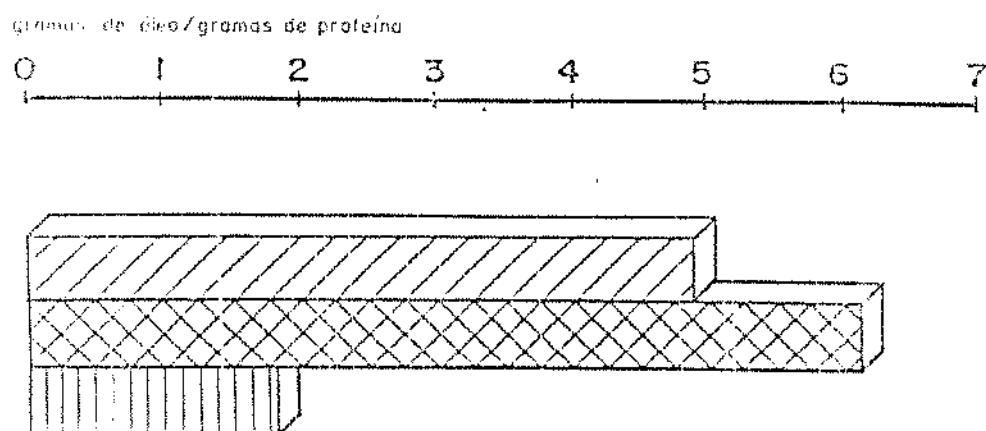





Figura 27 - Capacidade de absorção de óleo.

-  Concentrado protéico foliar de mandioca obtido por ultrafiltração.
-  Concentrado protéico foliar de mandioca obtido por termocoagulação.
-  Concentrado protéico de soja.

IV.19.3- Capacidade espumante e estabilidade da espuma

Na Tabela XXVII apresentam-se os valores obtidos nas determinações da capacidade espumante e estabilidade da espuma do concentrado protéico obtido por ultrafiltração, do concentrado protéico obtido por termocoagulação e do concentrado protéico de soja, determinados a diferentes valores de pH de 2 a 10.

Dos dados obtidos pode-se observar que a capacidade espumante do concentrado protéico de mandioca obtido por ultrafiltração é superior ao do concentrado obtido por termocoagulação, ambos os concentrados resultam ser superiores quando são comparados com o concentrado protéico de soja. Convém fazer notar que não se observa uma tendência definida da influência do pH na capacidade de formação de espuma. No concentrado por ultrafiltração a máxima capacidade espumante manifestou-se a pH entre 2 e 4, no concentrado por termocoagulação esta capacidade manifestou-se entre pH 6 e 8, enquanto que o concentrado de soja apresenta valores menores em toda a escala de pH com um ligeiro incremento a pH 4.

Alguns autores como KINSELLA (1979), LEE e LOPEZ (1984), WANG e KINSELLA (1976b) manifestam que a capacidade espumante das proteínas são mais acentuadas no pH perto ao seu ponto isoelétrico, isto concorda com o apresentado pelo concentrado protéico ultrafiltrado e concentrado protéico de soja, não sendo assim para o concentrado protéico termocoagulado. Convém ressaltar que a capacidade espumante

também está influenciada pelo processamento como o demonstram os trabalhos de WANG e KINSELLA (1976b) que encontraram que a extração das proteínas com solvente, melhora significativamente a capacidade espumante dos concentrados. BUCKINGHAM (1970) e BETSCHART (1974) encontraram na proteína foliar citoplasmática maior capacidade de formação de espuma quando foi obtida por precipitação ácida do que quando foi obtida por termocoagulação. Estas considerações podem explicar parcialmente os diferentes resultados obtidos no presente trabalho.

O concentrado protéico termocoagulado obtido no presente estudo e o mencionado por TORRES (1980), apresentam valores de capacidade de formação de espuma menores que o obtido por ultrafiltração, pelo que pode-se deduzir que a ultrafiltração melhorou a propriedade funcional de formação de espuma no concentrado protéico.

HUMPHRIES (1982) menciona que a capacidade espumante do concentrado protéico de alfafa sem fracionar determinada a pH entre 2 e 6 é comparável à da albumina de ovo; neste trabalho, o concentrado protéico de folha de mandioca obtido por ultrafiltração apresentou maiores valores desta propriedade a essas faixas de pH (2 a 6) ao ser comparada com a do concentrado protéico de soja.

IV.19.3.1- Estabilidade da espuma

Na Tabela XXVII são apresentados os resultados de estabilidade da espuma para o concentrado protéico obtido por ultrafiltração e obtido por termocoagulação e para o concentrado

protéico de soja, a diferentes valores de pH. Pelos resultados obtidos pode-se observar que a estabilidade da espuma em ambos os concentrados protéicos foliares é muito reduzido, manifestando-se um pequeno incremento na faixa de pH entre 4 e 6. O concentrado protéico ultrafiltrado apresentou maior estabilidade da espuma que o concentrado protéico obtido por termocoagulação, esta diferença entre os dois concentrados protéicos também pode ser atribuída ao tratamento térmico no termocoagulado cuja influência negativa para esta propriedade também é manifestada em trabalhos de ELDRIDGE (1963).

Os menores valores de estabilidade da espuma a pH alcalinos em comparação com os de pH ácidos para o concentrado protéico obtido por ultrafiltração do presente estudo, concorda com o reportados por WANG e KINSELLA (1976b) no sentido de que os pH alcalinos não somente tendem a baixar a estabilidade da espuma, como também a espuma formada é seca e frágil.

A capacidade de formação da espuma e a sua estabilidade que apresentam o concentrado protéico ultrafiltrado e o termocoagulado são muito limitadas e apresentam poucas perspectivas de ter aplicação em produtos de confeitaria, pastelaria, bebidas espumosas, merengues e outros produtos que requeiram esta propriedade.

Tabela XXVII - Capacidade formadora de espuma e estabilidade da espuma de concentrados protéicos foliares de mandioca obtidos por ultrafiltração e por termocoagulação e concentrado protéico de soja.

pH	Concentrado Ultrafiltrado		Concentrado Termocoagulado		Concentrado de soja	
	C.F.E.* %	E.E.** %	C.F.E.* %	E.E.** %	C.F.E.* %	E.E.** %
2	60,00	46,0	20,00	30,00	15,00	50,00
4	64,00	46,87	10,00	20,00	29,00	34,00
6	50,00	44,00	34,00	23,52	24,00	41,66
7	38,00	21,65	34,00	29,41	16,00	41,87
8	36,00	28,66	30,00	26,66	26,00	45,00
10	44,00	36,36	20,00	20,00	21,00	28,57
12	42,00	32,85	28,00	21,42	20,00	37,50

*C.F.E. = Capacidade formadora de espuma.

**E.E. = Estabilidade da espuma.

IV.19.4- Propriedades emulsificantes

Na Tabela XXVIII encontram-se os valores obtidos a diferentes valores de pH nas determinações da atividade emulsificante, da capacidade emulsificante e da estabilidade da emulsão em concentrado protéico de folha de mandioca obtido por ultrafiltração e por termocoagulação ácida, assim como do concentrado protéico de soja usado como referência.

O concentrado protéico ultrafiltrado, apresentou maior atividade emulsificante a todos os níveis de pH que o concentrado protéico termocoagulado e é ligeiramente superior ao concentrado protéico de soja a pH acima de 6.

A capacidade emulsificante se apresentou maior para o concentrado de soja que em ambos os concentrados protéicos foliares; no entanto, esta capacidade apresentou-se maior no ultrafiltrado que no termocoagulado. A estabilidade da emulsão resultou com valores similares para o concentrado protéico de soja e para o concentrado protéico ultrafiltrado e, ligeiramente inferior no concentrado termocoagulado.

A valores de pH próximos a neutralidade, a atividade emulsificante de 65% e a estabilidade da emulsão de 95,2% encontradas no presente trabalho para o concentrado protéico de mandioca ultrafiltrado, é muito similar à encontrada para o concentrado protéico de alfafa seco por "spray-drying" de 61,5 e 94,4%, respectivamente, reportados por KNUCKLES e KOHLER (1982). No entanto, a capacidade de emulsificação para este mesmo concentrado foi muito mais baixa (90,5 ml de óleo/g de proteína)

Tabela XXVIII - Atividade emulsificante, capacidade emulsificante, estabilidade da emulsão em função do pH de concentrados protéicos de folhas da mandioca obtidas por ultrafiltração, por termocoagulação e concentrado protéico de soja.

Amostra	pH	Atividade emulsificante %	Capacidade emulsificante *	Estabilidade da emulsão %
Concentrado protéico ultrafiltrado				
	2	50,5	70,3	80,0
	4	55,3	80,0	85,0
	6	65,0	90,5	95,2
	8	75,7	90,8	100,3
	10	75,0	95,0	95,5
Concentrado protéico termocoagulado				
	2	45,2	55,3	50,5
	4	40,8	70,2	60,0
	6	45,0	75,5	70,2
	8	50,5	75,0	70,2
	10	45,2	65,0	70,5
Concentrado protéico de soja				
	2	60,0	90,5	70,5
	4	70,0	120,2	80,0
	6	65,5	115,5	90,2
	8	60,2	110,0	90,8
	10	60,0	100,4	90,5

*ml de óleo por grama de proteína.

que os mencionados por estes mesmos autores para o concentrado de alfafa de 289 ml de óleo/g de proteína.

A alta porcentagem de atividade emulsificante que apresenta o concentrado de mandioca por ultrafiltração em comparação com o obtido por termocoagulação pode ser atribuída a que durante o processo de ultrafiltração as proteínas são desnaturadas num grau muito menor que pela termocoagulação. O efeito da desnaturação das proteínas por ação de tratamentos térmicos sobre as propriedades emulsificantes tem sido manifestado nos trabalhos de KNUCLES e KOHLER (1982), nos de AOKI e col. (1980) e nos de VOITSINAS e col. (1983).

IV.19.5- Propriedades de solubilidade

Na figura 28 expressa-se o comportamento da solubilidade das proteínas do concentrado protéico de folha de mandioca obtido por ultrafiltração e do obtido por termocoagulação em função de pH.

Como se pode observar a solubilidade das proteínas do concentrado ultrafiltrado é significativamente maior que a que apresenta o concentrado termocoagulado em todas as faixas de pH. É de se notar que a solubilidade do termocoagulado é mínima na faixa de pH entre 2 e 6, não sendo assim para o concentrado ultrafiltrado onde a mínima solubilidade se apresenta a um pH definido de 3.5 e é altamente solúvel a pH 9.

A maior solubilidade do concentrado ultrafiltrado em comparação com o termocoagulado, pode ser explicado pelo efeito do tratamento ácido e térmico sobre a desnaturação das proteínas e consequentemente a perda de solubilidade. Segundo HUMPHRIES (1982) a precipitação por calor de proteínas foliares as fazem praticamente insolúveis em todos os valores de pH, enquanto que a precipitação exclusivamente ácida, as proteínas são solúveis em faixas de pH de 2 a 4 e de 6 a 12.

O incremento de solubilidade que apresenta o concentrado ultrafiltrado com respeito ao termocoagulado encontrado no presente trabalho, coincide como o mencionado por HUMPHRIES (1982) referente a conveniência do uso de filtração por membranas para obter produtos solúveis.

Também é comparável ao manifestado por KNUCLES e col. (1982) os quais encontram maior solubilidade para proteínas de alfafa obtidas por ultrafiltração e secas por aspersão, comparadas com as obtidas por termocoagulação e sugerem que a ultrafiltração e diafiltração melhoram significativamente a solubilidade das proteínas foliares.

O perfil destes concentrados protéicos foliares de mandioca é também comparável com os resultados de KOHLER e KNUCLES (1977), os quais mencionam o decréscimo da solubilidade das proteínas de alfafa quando são obtidas por termocoagulação e a melhora da solubilidade quando são ultrafiltradas e diafiltradas, com o qual obtem-se as proteínas de alfafa insolúveis a pH 4,8, mas altamente solúveis a pH 6 a 12.

A alta solubilidade que apresenta o concentrado protéico ultrafiltrado de mandioca é uma vantagem considerável, já que nos indica a pequena desnaturação das proteínas durante o processamento, e sua possível utilização em processos de emulsificação, gelificação, atividade emulsificante e formação de espuma, já que nestes processos requiere-se uma alta solubilidade das proteínas (KINSELLA, 1979).

Em base às características funcionais e nutritivas que apresentam os concentrados protéicos foliares de mandioca, pode-se sugerir a sua incorporação em alimentos elaborados contendo cereais. Os alimentos elaborados a base de milho de grande consumo no México como "tacos", "quizadillas", "enchiladas", "pozole", etc. apresentam a possibilidade dessa incorporação. O problema de sabor, eventualmente introduzido pelos concentrados protéicos foliares poderiam ser superados, levando-se em consideração que esses alimentos são fortemente condimentados.

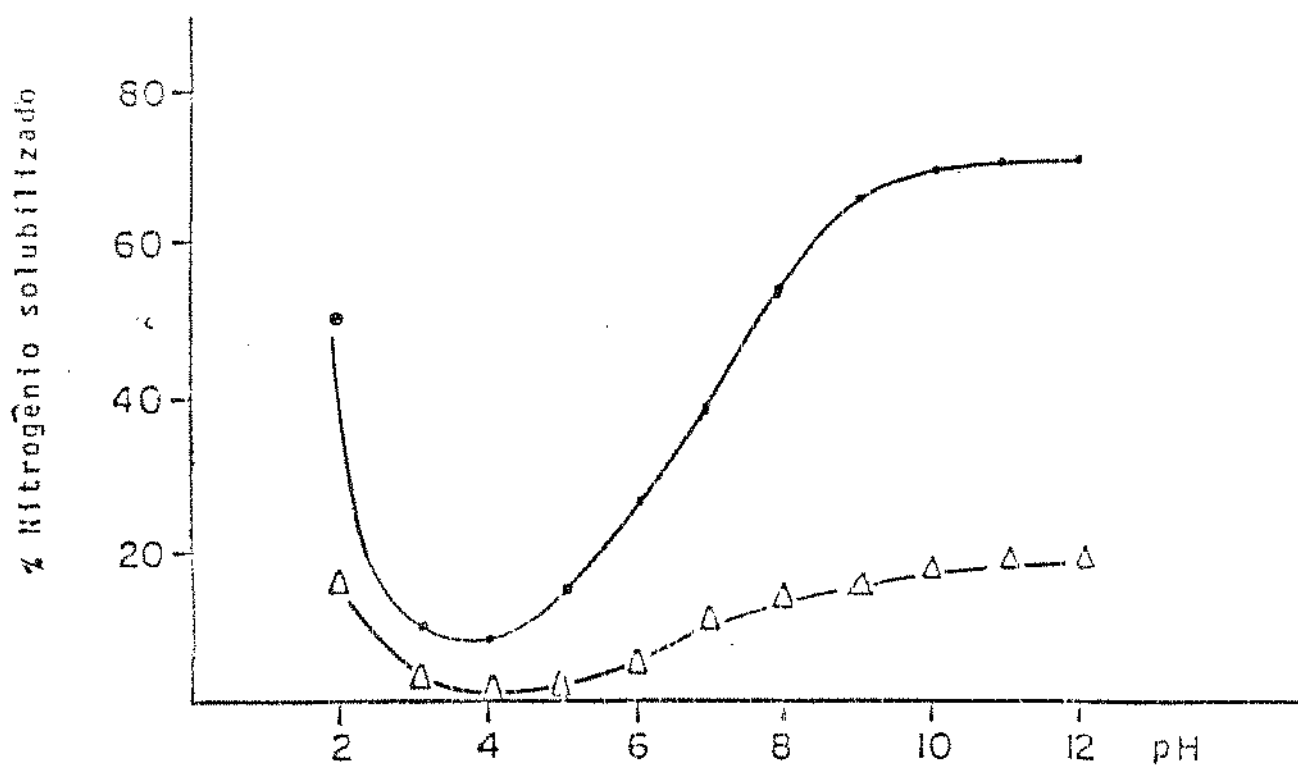


Figura 28 - Curva de solubilidade das proteínas do concentrado protéico das folhas de mandioca obtido por termocoagulação (Δ) e por ultrafiltração (\bullet).

V- CONCLUSÕES

Ao término deste estudo e pelos resultados obtidos podem ser tiradas as seguintes conclusões.

- Pelo fato das proteínas de folhas de mandioca apresentarem a particularidade de não precipitar a temperaturas altas a valores de pH acima de 7,5 foi possível o seu processamento em solução a 50°C.
- A temperatura de 50°C durante a ultrafiltração aumentou notavelmente a velocidade de concentração em comparação a efetuada a 25°C, porém não afetou o rendimento nem a composição centesimal do concentrado protéico.
- Com a ultrafiltração obteve-se maior rendimento de recuperação de proteínas em comparação com a termocoagulação ácida e com a precipitação isoeletrônica.
- Pelos estudos de eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio, de cromatografia em sephadex G-200 e por fracionamento por solubilidade das proteínas, pode-se sugerir que acontecem maiores alterações nas proteínas no processamento do concentrado protéico obtido por termocoagulação que no obtido por ultrafiltração.

- Durante a ultrafiltração a 50°C do extrato foliar, foi eliminado grande parte o cianeto livre procedente do cianeto combinado (glicosídeo cianogênico ou cianidrina), o que resultou num menor teor de cianeto total no concentrado protéico obtido por ultrafiltração.
- O conteúdo de lisina disponível, a digestibilidade "in vitro" e retenção de carotenos totais nos concentrados protéicos foliares foi maior quando obtido por ultrafiltração que por termocoagulação.
- O valor do Quociente de eficiência protéica (PER) do concentrado protéico foliar, foi maior quando obtido por ultrafiltração que por termocoagulação; o valor PER de ambos os concentrados foram sensivelmente melhorados quando são misturados com proteínas e gergelim.
- Os concentrados protéicos foliares de mandioca estudados apresentaram propriedades funcionais atrativas em relação a sua capacidade de absorver água, gordura e propriedades emulsificantes, não sendo promissor no que se refere as propriedades de espumabilidade. A solubilidade foi nitidamente superior no concentrado protéico obtido por ultrafiltração.

VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. 7a. ed. St. Paul, 1976.

ACTON, J.C.; ZEIGLER, BURGE, D.L.Jr. Functionality of muscle constituents in the processing of comminuted meat products. Critical Reviews in Food Sci. and Nutr. C.R.C. 18(2): 99-121, 1983.

ADEWUSI, S.R.A. Cyanide metabolism in plants and animals. Tese de Doutorado, citado por OKE, O.L. Tratamiento y Destoxificación de la Yuca, Seminário de Toxicidad de la Yuca y Tirioides, Aspectos de Investigación y Salud. Ed. F. Delange y R. Ahluwalia, Ottawa, Canadá. p. 131-135, 1984.

AKESON, W.R. & STHAMAN, M.A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. J. Nutr. 83: 257-261, 1964.

AKESON, W.R. & STHAMAN, M.A. Nutritional value of leaf protein concentrate, and in vitro digestion study. J. Agric. Food Chem. 13(2): 145-148, 1965.

ALLISON, R.M. Factors influencing the availability of lysine in leaf protein. In: Leaf Protein: its agronomy, preparation, quality and use. I.B.P. Handbook Nº 20. Blackwell Sci. Publ. PIRIE, N.W. ed. London, England. p. 78, 1971.

AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14a. Edition. Sidney Williams ed, 1984.

AOKI, H.; TANEYAMA, O. & INAMI, M. Emulsifying properties of soy protein: Characteristics of 7 S and 11 S proteins. J. Food. Sci. 45: 534-538, 1980.

ARJONA, L.A. Aislamiento y evaluación nutricional y funcional de la proteína procedente de la pasta residual de ajonjolí obtenida en la extracción del aceite. Tese Faculdade de Química. U.N.A.M., México, D.F. México, 1984.

ARKCOLL, D.B. The preservation and storage of leaf protein preparations. J. Sci. Food Agric. 24(4): 437-445, 1973.

ARKCOLL, D.B. & HOLDEN, M. Changes in chloroplast pigment during the preparation of leaf protein. J. Sci. Food Agric. 24: 1217-1227, 1973.

BARANIAK, B.; BARANIAK, A. & BUBIEZ, M. Fraccionation of alfalfa juice protein to chloroplastic and cytoplasmatic leaf protein concentrates by application of polyelectrolytes. The Second International Conference on Leaf Protein Research. August 22-29. Nagoya and Kyoto, Japan, 1985.

BECKER, H.C.; MINER, R.T. & NAGEL, R.H. A method for the determination of nonprotein nitrogen in soybean meal. Cereal Chem. 17: 447-457, 1940.

BENDER, A.E. Chemical scores and availability in: Proteins in Human Nutrition. Porter, J.W.G. & Rolls, B.A. ed. London, Academic Press, p. 167, 1973.

BEROT, S. & DAVIN, A. Technologie d'extraction et de purification des matieres proteiques vegetales. En: Proteines Vegetales. Gordon, B. Coord. Paris, France, p. 387, 1985.

BETSCHART, A. & KINSELLA, J.E. Extractability of leaf protein. J. Agric. Food Chem. 21(1): 60-65, 1973.

BETSCHART, A.A. Nitrogen solubility of alfalfa protein concentrate as influenced by various factors. J. Food Sci. 39(6): 1110-1115, 1974.

BETSCHART, A.A. & KINSELLA, J.E. Influence of storage on composition amino acids content and solubility of soy beans leaf protein concentrate. J. Agric. Food Chem. 22(1): 116-123, 1974.

BEWLEY, J.D. & BLACK, M. Physiology and biochemistry of seed. Springer-Verlag. New York, p. 229-237, 1978.

BRAY, W.J. & HUMPHRIES, C. Preparation of white leaf protein concentrate using a polyanionic flocculant. J. Sci. Food Agric. 30(2): 171-176, 1979.

BRAY, W.J.; HUMPHRIES, C. & INERITE, M.S. The use of solvents to decolorise leaf protein concentrate. J. Sci. Food Agric. 29(2): 165-171, 1978.

BREKKE, C.J. & EISELL, T.A. The role of modified proteins in processing of muscle foods. Food Technol. (Chicago) 35(5): 231-234, 1981.

BRITO, O. & NUNEZ, N. Evaluation of sesame flour as a complementary protein source for combinations with corn flour. J. Food Sci. 47: 457, 1982.

BUCKINGHAM, J.H. Effect of pH, concentration and temperature on the strength of cytoplasmic protein foams. J. Sci. Food Agric. 21(9): 441-445, 1970.

BURGHOFFER, Ch.; COSTES, C.; RAMBOURG, J.C.; GASTINEAU, I. & De MATHAN, D. Amélioration du procédé industriel d'extraction de la protéine blanche de luzerne. Caractérisation de L'isolat obtenu destiné a l'alimentation humaine. Sciences des Aliments. J. International de Science et de Technologie des Aliments, Paris, Francia 7 (1): 111-134, 1987.

BYERS, M. The amino acid composition and in vitro digestibility of some protein fractions from three species of leaves of various ages. J. Sci. Food Agric. 22: 242, 1971a.

BYERS, M. The amino acid composition of some leaf protein preparation in: Leaf Protein: Its Agronomy, Preparation, Quality, and Use. I.B.P. Handbook N° 20, Blackwell Sci. Publ. London, England. p. 184, 1971b.

CALDWELL, R.W. Processed plant protein foodstuff. Altschull, A. Edt. Academic Press, New York, p. 553, 1958.

CAMICI, M.; BALESTRERI, E.; TOZZI, G.M.; BACCIOLA, D.; SARACCHI, I.; FELICIOLO, R. & IPATA, P.L. Relationship between enzyme levels and extractable proteins in alfalfa. J. Agric. Food Chem. 28(3): 500-503, 1980.

CARLSSON, R. & HANCZAKOWSKI, P. The nutritive value of mixtures of white leaf protein and other food proteins. J. Sci. Food Agric. 36: 946-950, 1985.

CHAKRABARTI, S. Studies on biochemical composition on nutritive value of LPC samples of four different types of crops. XV International Grassland Congress. Kyoto, Japan, 1985.

CHANG, H.Y.; REECK, G.R. & MITCHELL, H.C. Alfalfa trypsin inhibitor. J. Agric. Food Chem. 26(1): 1463-1464, 1978.

CHEEKE, P.R. Nutritional and physiological properties of saponins. Nutrition Reports International. 13(3): 315-324, 1976.

CHIBNALL, A.C.; REES, M.W. & LUGY, J.W.H. The aminoacid composition of leaf protein. J. Sci. Food Agric. 14: 234, 1963.

CHOI, Y.R.; LUSAS, E.W. & RHEE, K.C. Effect of succinylation cottonseed flour during protein extraction on the yield and some of the properties of protein isolates. J. Food Sci. 46(3): 954-955, 1981.

CHOU & MORR, C.V. Protein-water interaction and functional properties. J. Am. Oil Chem. Soc. 56(1): 53A-62A, 1979.

CLIFFORD, A.J.; VASCONCELLOS, J.A.; FORMAN, L.P. LUMIJARVI, D.; WEIR, W.C. Nucleic acid content and nutritional value of green and white leaf proteins of alfalfa. Nutr. Report Intern. 15(5): 511-518, 1977.

COHEN, M.; GINOZO, W.; DORNER, R.W.; HUDSON, W.R. & WIDMAN, S.G. Solubility and color characteristics of leaf protein in air and nitrogen. *Science*. 124: 1081. 1956.

COOKE, R.D. An enzymatic assay for total cyanide content of cassava. *J. Sci. Food Agric.* 29(4): 345-352, 1978.

COOKE, R.D. Efecto del procesamiento de la Yuca sobre el cianuro residual. Seminario de Toxicidad de la Yuca y Tirioides: Aspectos de Investigación y Salud. Eds. F. Delange y R. Ahluwalia, Ottawa, Canada, p. 140-144, 1984.

COON, E. Cyanogenic glucosides in: *Toxican occurring naturally in foods*. National Academic of Science, 2nd. ed. Washington, D.C. p. 298-307, 1973.

COSTES, C. Protéines foliaires et alimentation dans la collection "Biochimie Appliqué". Gouthier-Villars. Paris, France, 1981.

COWAN, J.W.; ESFAHANI, M.; SALJI, J.P. & AZZAN, S.A. Effect of phytate on iron absorption in the rat. *J. Nutr.* 90: 423-427, 1966.

DAVIS, N.T. & NIGHTINGALE, R. The effects of phytate on intestinal absorption and secretion of zinc, and whole-body retention of zinc, copper, iron and manganese in rats. Brit. J. Nutr. 34: 243, 1975.

de BRUJIN, G.H. Etude du caractere cyanogénétique du manioc (Manihot esculenta Crantz.). Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen, 71-73, en: de Brujin, G.H. Necesidad de Reducir la Cianogénesis de la Yuca. Seminario de Toxicidad de la Yuca y Tirioides: Aspectos de Investigación y Salud. Ed. F. Delange y R. Ahluwalia, Ottawa, Canada, p. 121-124, 1984.

de BRUJIN, G.H. Necesidad de reducir la cianogénesis de la Yuca. Seminario de Toxicidad de la Yuca y Tirioides: Aspectos de Investigación y Salud. Ed. F. Delange y R. Ahluwalia, Ottawa, Canada, p. 121-124, 1984.

DE FREMERY, D. BICKOFF, E.M. and KOHLER, G.O. PRO-XAN Process: Stability of proteins and carotenoid pigments in freshly expressed alfalfa juice. J. Agric. Food Chem. 20(6): 1155-1158, 1972.

DEVADAS, R.P. & VIJAYALAKSHMI, . Use of protein as human food. XV International Grassland Congress. Kyoto, Japan, 1985.

DENCH, J.E.; NILO RIVAS, R. & CAYGILL, J.C. Selected functional properties of sesame (Sesamum indicum L.) flour and two protein isolate. J. Sci. Food Agric. 32: 557-564, 1981.

DORAISWAMY, T.R.; SINGH, N. & DANIEL, V.A. Effects of supplementing ragi (Eleusine coracana) diets with lysine or leaf protein on the growth and nitrogen metabolism of children in India. Brit. J. Nutr. 23: 737, 1969.

DOUILLARD, R. Composés lipidiques accompagnant les protéines foliaires en: Protéines Foliaires et Alimentation. Costes, C. Ed. Paris, France, p. 69-91, 1981.

DOUILLARD, R. Propriétés biochimiques et physico-chimiques des protéines des feuilles en: Protéines Vegetales. B. Godon Coord. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris, France, p. 211-240, 1985.

DOUILLARD, R. & MARION, D. Répartition des saponines dans les produits obtenus lors de la préparation de protéines de feuilles de luzerne. Sciences des Aliments. J. International de Science et de Technologie des Aliments. Paris, France, 2(1): 135-146, 1987.

EAKIN, D.E.; SINGH, R.P.; KOHLER, G.D. & KNUCLES, B. Alfalfa protein fractionation by ultrafiltration. J. of Food Sci. 43(2): 544-547, 1978.

EGGUM, B.O. The protein quality of cassava leaves. Brit. J. Nutr. 24: 761, 1970.

ELDRIDGE, A.D.; HALL, P.K. & W.J. WOLF. Stable foams from unhydrolyzed soy beans protein. Food Technology. 17: 1592, 1963.

EL TINAY, A.H.; KHATTAB, A.H. & KHIDER, M.O. Protein and oil composition of sesame seed. J. Am. Oil Chem. Soc. 53: 648-653, 1976.

ERDMAN, J.W. Oilseed phytates: Nutritional Implications. J. Am. Oil Chem. Soc. 56: 736-741, 1979.

ERIKSSON, C.E. Lipid oxidation catalysts and inhibitors in raw material and processed foods. Food Chemistry, 2: 3-19, 1982.

ERMANS, A.M.; BOURDOUX, P.; KINTHAERT, J.; LAGASSE, R.; KUVIVILA, K.; MAFUTA, M.; THILLY, C.H. & DELANGE, F. Seminario de Toxicidad de la Yuca y Tirioides: Aspectos de Investigación y Salud. Ed. F. Delange y R. Ahluwalia, Ottawa, Canada, p. 7-15, 1984

FINLEY, J.W.; PALAVICINI, C.; KOHLER, G.O. Partial isolation and characterization of medicago sativa leaf proteases. J. Sci. Food Agric. 31(2): 156-161, 1980.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Energy and protein requirements; report of a joint FAO/WHO. Geneva, WHO, 1973. p. 62-4 (WHO technical report series, 522; FAO Nutrition Meeting report series, 52).

FORBES, R.M. & PARKER, H.M. Biological availability of zinc in and as influenced by whole fat soy flour in rat diets. Nutr. Report. Int. 15(6): 681-688, 1977.

FORBES, R.M. Mineral utilization in the rat. Effects of calcium, phosphorus and source of protein in zinc-deficient and in-zinc adequate diets. J. Nutrition. 83: 225-233, 1964.

FOX, P.F.; MORRISEY, P.A. & MULVIHILL, D.M. Chemical and enzymatic modification of food proteins. In: Development in Food Proteins. HUDSON, B.J. ed. p. 20, 1982.

FRANZEN, K.L. & KINSELLA, J.E. Functional properties of succinylated and acetylated leaf protein. J. Agric. Food Chem. 24(5): 914-919, 1976.

GARDNER, H.W. Lipid hydroperoxide reactivity with protein and amino acid: a review. J. Agric. Food Chem. 27(2): 220-229, 1979.

GERLOFF, E.D.; LIMA, I.H. & STHAMANN, M.A. Amino acid composition of leaf protein concentrates. J. Agric. Food Chem. 13(2): 139, 1965.

GILLBERG, L. & TURNELL, B. Preparation of rapeseed protein isolates. Dissolution and precipitation behaviour of rapeseed proteins. J. Food Sci. 41(5): 1063-1069, 1976.

GROSSMAN, S.; BEN-AZIS, A.; ASCARELLI, I. & BUDOWSKI, P. Lipoxigenase from medicago sativa: purification on hidroxiapatita. Phytochem. 13: 1379-1381, 1974.

GROVES, W.E.; DAVIS, F.C.Jr. & SELLS, B.H. Spectrophotometric determination on microgram quantities of protein without nucleic acid interference Anal. Biochemistry. 22: 195-210, 1968.

GUEGUEN, J.; LOISEIL, W. & BARBOT, J. Automatic determination of pH solubilization curve for vegetable protein. Can. Inst. of Food Science and Technology Journal, 15(2): 131-136, 1982.

GUEGUEN, J. & AZANZA, J.C. Propriétés biochimiques et physico-chymiques des protéines végétales. En: Protéines végétales. GORDON, B. Coord. Paris, Franca, p. 135-160, 1985.

GUEYASUDDIN, S.; CATER, C.M. & MATTIL, K.F. Effect of several variables on the extractability of sunflower seed protein. J. of Food Sci. 35: 453-546, 1970.

HAHN, S.K., 1984. Investigaciones sobre yuca encaminadas a superar las limitaciones a su producción y utilización en África. En: Seminario de Toxicidad de la Yuca y Tirioides: Aspectos de Investigación y Salud. Ed. F. Delange y R. Ahluwalia, Ottawa, Canada, p. 95-104, 1982.

HATANAKA, A.; SERIVA, J. & KAJIWARA, I. Distribution of an enzyme system producing Cis-3 hexanal from linolenic and linoleic acids in some plants. *Phytochemistry*. 17: 869-872, 1978.

HAUFFMAN, V.L.; LEE, C.K. & BURNS, E.E. Selected functional properties of sunflower meal (Helianthus annus). *J. Food Sci.* 40(1): 70-74, 1975.

HEGSKETED, M. & LINKSWILER, H.M. Proteins quality oh high and low saponin alfalfa proteins concentrates. *J. Sci. Food Agric.* 31: 777-781, 1980.

HERMANSSON, A.M. Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins. *J.A.O.C.S.* 56(3): 272-279, 1979.

HOOD, L.L. & BRUNNER, J.K. Isolation and partial characterization of soluble alfalfa protein. *Econ. Bot.* 30: 285-289, 1976.

HUDSON, B.J.F. & KARIS, I.G. Aspects of vegetable structural lipids I. The lipids of leaf protein concentrate. J. Sci. Food Agric. 24(12): 1541-1550, 1973.

HUDSON, B.J.F. & KARIS, I.G. Stability of lipids and proteins in leaf protein concentrate. J. Sci. Food Agric. 27(5): 443-448, 1976.

HUMPHRIES, C. Towards leaf protein as a human food in: Food Protein-1. Ed. Hudson, B.J.F. London, p. 263-268, 1982.

HSU, D.L.; LEUNG, H.K.; MORAD, M.M.; FINNEY, P.L. & LEUNG, C.T. Effect of germination on electrophoretic functional and bread-baking properties of yellow pea, lentil and faba beans protein isolated. Cereal Chem. 59(5): 344-350, 1982.

JOHAL, S.; BOURQUE, D.P.; SMITH, W.W.; SUH, S.W.; EISENBERG, D. Crystallization and characterization of ribulose 1.5 bisphosphate carboxylase/oxygenase from eight plant species. J. Biol. Chem. 255: 8873-8880, 1980.

JOHNSON, A.; SULEIMAN, T.M. & LUSAS, E.W. Sesame protein: A review and prospects. J. Am. Oil Chem. Soc. 56: 463-468, 1979.

JOHNSON, E.A. & BREKKE, C.J. Functional properties of acylated pea protein isolated. J. Food Sci. 48(3): 722-725, 1983.

- JOHNSON, D.W. Functional proteins of oil seed proteins. J. Am. Oil Chem. Soc. 47(10) 402-407, 1970.
- KABIRULLAH, M. & WILLS, R.H.H. Functional properties of acetylated and succinylated sunflower protein isolates. J. Food Technol. 17: 235-249, 1982.
- KAKADE, M.L. & LIENER, I.E. Determination of available lysine in proteins. Analytical Biochemistry. 27: 273-280, 1969.
- KALBRENER, J.E.; ARNER, K. & ELRIDGE, A.C. Flavours derived from linoleic and linolenic acid hydroperoxides. Cereal Chem. 51: 406-416, 1976.
- KAMALANATHAN, G.; DEVADAS, R.P. & VIJAYALAKSIMI, P. Nutrition education for popularizing leaf protein. II International Conference on Leaf Protein Research (LEAFRO 85). Nagoya, Japan, 1985.
- KAREL, M.; SCHIC, K. & ROY, R.B. Interaction of peroxidizing methyl linoleate with some proteins and amino-acids. J. Agric. Food Chem. 23(2): 159-163, 1975.
- KINSELLA, J.E. Functional properties of proteins in foods. A survey. Critical Review in Food Sci. and Nutr. C.R.C. 2(3): 219-280, 1976.

KINSELLA, J.E. Functional properties of soy protein. J. Am. Oil Chem. Soc. 56: 242-258, 1979.

KINSELLA, J.E. Functional properties of proteins. Possible relationships between structure and function in foams. Food Chem. 7: 273-288, 1981.

KINSELLA, J.E. & MOHITE, R.R. The physicochemical characteristics and functional properties of sesame proteins. In: New proteins foods. Vol. 5. Academic Press, Inc. p.435-456, 1985.

KOHLER, G.D. & KNUCKLES, B.E. Edible protein from leaves. Food Technology. May: 191-195, 1977.

KOHLER, G.D. & BICKOFF, E.M. Commercial production from alfalfa in U.S.A. In: Leaf protein, its agronomy, preparation, quality and use. I.B.P. Handbook No 20. Blackwell Sci. Publ. (PIRIE, N.W. Ed.). London, England. p. 218, 1971.

KNUCKLES, B.E.; EDWARDS, R.H.; MILLER, R.E. & KOHLER, G.D. Pilot scale ultrafiltration of clarified alfalfa juice. J. Food Sci. 45(3): 730-734, 1980a.

KNUCKLES, B.E.; EDWARDS, R.H.; KOHLER, G.D. & WHITNEY, L.F. Flocculants in the separation of green and soluble white protein fraction from alfalfa. J. Agric. Food Chem. 28(1): 32-36, 1980b.

KNUCKLES, & KOHLER, O.G. Functional properties of edible proteins concentrates from alfalfa. J. Agric. Food Chem. 30(3): 748-752, 1982.

KUNG, S.D.; SAUNDERS, J.A.; TSO, T.C.; VAUNGHAN, D.A.; WOMACK, M.; STAPLES, R.C.; BEECHER, G.R. Tobacco as a potential food source and smoke material: nutritional evaluation of tobacco leaf protein. J. Food Sci. 45: 320-327, 1980.

KUZMICKY, D.F.; LIVINSTON, A.C.; KNOWLES, R.E.; KOHLER, G.O.; GUENTHNER, E.; OLSON, D.E. & CARSON, C.W. Xantophyl availability of alfalfa leaf protein concentrate (Pro-Xan) for broilers and laying hens. Poultry Sci. 56(5): 1504-1509, 1977.

LAWHON, J.T.; HENSLEY, D.W.; MULSOW, D. & MATTIL, K.M. Optimization of protein isolate production from soy flour using industrial membrane systems. J. Food Sci. 43(2): 361-364, 1978.

LAWHON, J.T.; HENSLEY, D.W.; MIZUKOSHI, M. & MULSOW, D. Alternate processes for use in soy protein isolation by industrial ultrafiltration membranes. J. Food Sci. 44(1): 213-215, 1979.

LEE, J.W. & LOPEZ, A. Modification of plants proteins. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 21: 289-322, 1984.

LEWIS, M.J. Concentration of protein by ultrafiltration in: Development in Food Proteins-1. HUDSON, B.J.F. Ed. London, p. 91, 1982.

LIENER, I. Significance for humans of biologically active factors in soy beans and other food legumes. J. Am. Oil Chem. Soc. 56: 121-129, 1979.

LIN, M.J.K.; HUMBERT, E.S. & SOSULSKY, F.W. Certain functional properties of sunflower meal products. J. Food Sci. 39(2): 368-370, 1974.

LIVINGSTONE, A.L.; KNUCKLES, B.E.; EDWARDS, R.H.; DE FREMERY, D.; MILLER, R.E. & KOHLER, G.O. Distribution of saponin in alfalfa protein recovery systems. J. Agric. Food Chem. 27(2): 362-365, 1979.

LIVINGSTONE, A.L.; KOHLER, G.O. & KUSMICKY, D.D. Comparison of carotenoid storage stability in alfalfa leaf protein (Pro-Xan) and dehydrated meals. J. Agric. Food Chem. 28(3): 652-658, 1980.

LOMBARD, J.H. & LANGE, D.J. The chemical determination of triptophan in food and mixed diets. Analytical Biochemistry. 10: 260-265, 1965.

- LOREZI, J.O.; GUTIERREZ, L.E.; NORMANHA, E.J. & CIONE, J. Variação de carboidratos e ácido cianídrico em raízes de mandioca após a poda da parte aérea. *Bragantia*, 37(16): 139-144, 1978.
- LUCAS, B.; & SOTELO, A. A simplified test for the quantitation of cyanogenic glucosides in wild and cultivated seeds. *Nutr. Report. Inter.* 29(3): 711-719, 1984.
- LYON, C.K.; KOHLER, G.O. Stabilization of carotene and xanthophyl in alfalfa leaf protein concentrates. *J. Agric. Food Chem.* 30(5): 934-937, 1982.
- MAGA, A.J. Phytate: Its chemistry, occurrence, food interactions nutritional significance and methods of analysis. *J. Agric. Food Chem.* 30(1): 1-9, 1982.
- MARION, D. & DOUILLARD, R. Les interactions des protéines et des lipides dans les produits vegetaux en: *Protéines végétales*. GODON, B. Coord., Technique et Documentation. Lavoisier, Paris, Franca, p. 269-279, 1985.
- McWATTERS, K.H. & HOLMES, M.R. Influence of pH and salt concentration on nitrogen solubility and emulsification properties of soy flour. *J. Food Sci.* 44(3): 770-781, 1979.

MEUSER, F. & SMOLNIK, H.D. Processing of cassava to gari and other foodstuffs. *Starch/Starke* 32, 116, 1979. En: OKE, O.L, 1982. Tratamiento y Destoxificación de la Yuca. Seminario sobre Toxicidad de la Yuca y Tirioides: Aspectos de Investigación y Salud. Ed. F. Delange y R. Ahluwalia, Ottawa, Canadá, p. 131-135, 1984.

MILLER, R.E.; DE FREMERY, D.; BICKOFF, E.M. & KOHLER, G.O. Soluble protein concentrate from alfalfa by low-temperature, acid precipitation. *J. Agric. Food Chem.* 23(6): 1177-1179, 1975.

MITCHELL, H.L. & HUAGE, S.M. Enzimatic nature of the carotene destroying system of alfalfa. *J. Biol. Chem.* 163: 7-14, 1946.

MOJARRO, B.S. Caracterización bioquímica de concentrado proteico de hoja de yuca (Manihot esculenta Crantz.). Tesis de Mestrado, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN, México, D.F. México, 1982.

MONTIES, B. Les antinutritionnels. en: *Protéines foliaires et alimentation*. Ed. Costes, Paris, França, p. 93-120, 1981.

MONTGOMERY, R.D. Cyanogens in: *Toxic constituents of plant foodstuffs*. Academic Press, New York, p.143-157, 1969.

- MORRISON, J.E. & PIRIE, N.W. The large-scale production of protein from leaf extracts. J. Sci. Food Agric. 12(1): 1-5, 1961.
- MUSTAKAS, G.C. & SOHNES, V.E. Soy processes equipment. Capital and processing cost. Cereal Food Word. 24(8): 330-339, 1979.
- NAGY, S.; TELEK, L.; HALL, T. & BERRY, E.R. Potential food uses for protein from tropical and subtropical plant leaves. J. Agric. Food Chem. 26(5): 1016-1028, 1978.
- NELSON, T.S.; MCGILLIVRAY, J.J.; SHIEH, T.R.; WODZINSKI, R.I.; WARE, J.H. Effect of phytate on the calcium requirement of chicks. Poultry Sci. 47(6): 1985-1989, 1968.
- NIELSEN, B.; HEVIA, P. & BRITO, O. Study on the complementation of two proteins of low quality: black bean (Phaseolus vulgaris) and sesame (Sesamun indicum L.). J. Food Sci. 48: 1804-1806, 1983.
- NILO-RIVAS, R.; DENCH, J.E. & CAYGILL, J.C. Nitrogen extractability of sesame (Sesamun indicum L.) seed and preparation of two protein isolats. J. Sci. Food Agric. 32: 565, 1981.
- NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION. Diet catalog. of ICN. Cleveland, pag. 24, 1977 and 1978.

OKE, O.L. The role of hydrocyanic acid in nutrition casava as food in Nigeria. World Review of Nutrition and Dietetics. 11: 170. 1969. En: OKE, O.L. Tratamiento y detoxificación de la yuca. Seminario sobre Toxicidad de la Yuca y Tírioides: Aspectos de Investigación y Salud. Ed. F. Delange y R. Ahluwalia, Ottawa, Canadá, p. 131-135, 1984.

OKE, O.L. Tratamiento y detoxificación de la yuca. Seminario sobre Toxicidad de la Yuca y Tírioides: Aspectos de Investigación y Salud. Ed. F. Delange y R. Ahluwalia, Ottawa, Canadá, p. 131-135, 1984.

OKUBO, K. WALDROP, A.B.; IACOBUCCI, G. & MYERS, D.V. Preparation of low-phytate soy-bean protein isolate and concentrate by ultrafiltration. Cereal Chem. 52(2): 263-271, 1975.

OKUBO, K.; NISHIMURA, N. & SHIBASAKI, K. Composition of sesame seed protein components and purification of the main globulin. Cereal Chem. 56(2): 100-104, 1979.

OMOSAIYE, O.; CHERYAN, M. & MATTHEWS, M.E. Removal of oligosaccharides from soybean water extracts by ultrafiltration. J. Food Sci. 43: 354-360, 1978.

OMOSAIYE, O. & CHERYAN, M. Ultrafiltration of soybean water extracts: processing characteristics and yields. J. Food Sci. 44(4): 1027-1031, 1979.

DOMAH, B.O. & BUSHUK, W. Characterization of lupine proteins. J. Food Sci. 48(1): 38-41, 1983.

OSTROWSKI-MEISSNER, T.M. Quantities and quality of protein extracted from pasture herbage using heat precipitation or ultrafiltration procedures. J. Sci. Food. Agric. 31: 177-187, 1980.

OSTROWSKI-MEISSNER, T.M. Social trends emerging in a mexican village community involved in a leaf nutrient supplementation project offered as a nutritional scheme. XV International Grassland Congress, Kyoto, Japan, 1985.

PETTERSON, D.W. Some properties of a factor in alfalfa meal causing depression of growth in chicks. J. Biol. Chem. 183: 647-653, 1950.

PETIT, L. Obtention des isolats protéiques. En: Protéines foliaires et alimentation. COSTES, C. ed. Paris, França, p. 149-157, 1981.

PHILLIPS, T.P. El consumo y la producción de la yuca: un resumen. Seminario sobre Toxicidad de la Yuca y Tirioides: Aspectos de Investigación y Salud. Ed. F. Delange y R. Ahluwalia, Ottawa, Canadá, p. 85-90, 1984.

PIRIE, N.W. Leaf protein: Its agronomy, preparation, quality and use. IBP Handbook Nº 20. Blackwell Sci. Publ. London, England, 1971.

PIRIE, N.W. Leaf protein and other aspects of fodder fractionation. Cambridge Univ. Press., p. 183, 1978.

POUR-EL, AKIVA. Protein functionality, classification, definition and methodology. In: Protein functionality in food. CHERRY, J.P. Ed. A.C.S. Symp. Ser. 147. Washington, D.C. 1-21 1981.

RAMIRES, S.J. & MITCHELL, H.L. The trypsin inhibitor of alfalfa. J. Agric. Food Chem. 8(5): 393-395, 1960.

REDDY, N.R.; SALUNKLE, D.K.; SATHE, S.K. Biochemistry of black gram (Phaseolus mungo L.). A review. C.R.C. Critical Review in Food Science and Nutrition. p. 78, 1982.

REID, M.S. & BIELESKY, R.L. A simple apparatus for vertical flat-sheet polyacrylamide gel electrophoresis. Analytical Biochemistry. 22: 374-381, 1968.

RENVOIZE, B.S. The area of origin of Manihot esculenta as a crop. A review of the evidence. Econ. Boit. 26: 352-360, 1972.

RESHEF, G.; GESTEINER, B.; BIRK, Y. & BONDI, A. Effect of alfalfa saponins on the growth and some aspects of lipids metabolism of mice and quails. J. Sci. Food Agric. 27(1): 63-72, 1976.

RHEE, K.C.; CARTER, C.M. & MATTIL, K.T. Simultaneous recovery of protein and oil from raw peanuts in a aqueous systems. J. Food Sci. 37(1): 90-93, 1972.

RIVAS BURGOS, J.I. Obtención de concentrado proteico de hojas de chaya (Chidoscolus chayamansa). Tesis de Mestrado, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN, México, D.F. México, 1984.

ROGER, Q.R. & HARPER, A.E. Amins acid diets and maximal growth in the rat. J. Nutrition, Batsesda, 87(3): 267-273, 1965.

RUIZ, D.V. Estudio nutricional a pastas alimenticias suplementadas con concentrado proteico de hojas de yuca (Manihot esculenta Crantz.). Rev. Tec. Alim. México, D.F. México. 20(2): 10-14, 1985.

SANCHEZ LIMON, M.C. Efecto de metodos de secado sobre las propiedades funcionales y nutricionales de concentrado proteicos foliares. Tese (em preparação). Departamento de Biotecnoloia y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. México, D.F. México, 1987.

SAUVANT, D. Proteínas foliares en alimentation animale. In: Protéines foliaires et alimentation. COSTES, C. Gauthier-Villars Paris, França, p. 211-227, 1981.

SHAMANTAKA SASTRY, M.C.; SUBRAMANIAN, N.S. & PARPIAL, H.A.B. Effect of Dehulling and heat processing and nutritive value of sesame proteins. J. Am. Oil Chem. Soc. 51(4): 115-118, 1974.

SHEEN, S.J. Functional properties of fraction I - Protein from tobacco leaf. J. Agric. Food Chem. 33(1): 79-83, 1985.

SHEN, J.L. Solubility and viscosity in: Protein functionality in food. CHERRY, J.P. Ed. ACS Symp. Ser. 147, Washington, D.C.: 89-109, 1981.

SHIDAR, K.S.; DESPHANDE, S.S. & SALUNKHE, D.K. Dry beans of phaseolus. A review. Part 1. Chemical composiiton: proteins. Critical Review in Food Science and Nutrition. FURIA, T. Ed. 22: 1-46, 1984.

SINGH, N. Feeding trials with children. In: Leaf protein, its agronomy, preparation, quality and use. (N.W. Pirie, Ed.). Oxford, England, 1971.

SOSULSKI, F.W. The centrifuge method for determining water absorption in hard red spring wheats. Cereal Chem. 39: 344-351, 1962.

SRIVASTAVA, G.P. & MOHAN, M. Biochemical composition and nutritive value of Morus alba leaf protein concentrates prepared by different methods of coagulation. 2^o International Conference on Leaf Protein Research (LEAPRO 85) Nagoya, Japan, 1985.

TANGENDJAJA, B.; BUCLE, K.A. & WOOTTON, M. Analysis of phytic acid by high-performance liquid chromatography. J. of Chromatography. 197: 274-277, 1988.

TORRES, M.M. Obtención de un concentrado proteico de hojas de yuca (Manihot esculenta Crantz.). Rev. de Tecnologia de Alimentos. México 15(2): 4-15, 1980.

TOZZI, M.G.; BALESTRERI, E.; CAMICI, M.; FELICIOLE, R. IPATA, P.C. Partial purification and characterization of a proteolytic activity of alfalfa juice. J. Agric. Food. Chem. 29: 1075-1078, 1981.

TUPYNAMBA, M.L.C.V. Isolation of cassava leaf protein and determination of its nutritive value. Nutr. Report Int. 16(6): 821-823, 1979.

TUPYNAMBA, M.L.C.V. & VIEIRA, E.C. Isolation of cassava leaf protein and determination of its nutritive value. Nutr. Report Int. 19(2): 249-259, 1979.

VALLI DEVI, A.; RAO, N.A.N & VIJAYARAGHAVAN, P.K. Isolation and composition of leaf protein from certain species of Indian flora. J. Sci. Food Agric. 16(2): 116-120, 1965.

VAN DE KAMER & VAN GINKEL. Rapid determination of crude fiber in cereal. Cereal Chem. 29(4): 239-251, 1952.

VAN ZANDER, R.J. The partial characterization of an alfalfa leaf protein concentrate. Ph.D. Thesis. Kansas State University, U.S.A, 1974.

VOUTSINAS, L.P.; CHEUNG, E. & NAKAI, S. Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. J. Food Sci. 48(1): 26-32, 1983.

WANG, J.C. & KINSELLA, J.E. Functional properties of alfalfa of novel proteins: alfalfa leaf protein. J. Food Sci. 41(2): 286-292, 1976a.

- WANG, J.C. & KINSELLA, J.E. Functional properties of alfalfa leaf: Foaming. J. Food Sci. 41(3): 498-501, 1976b.
- WATERLOW, J.C. The absorption and retention of nitrogen from leaf protein by infants recovering from malnutrition. Brit. J. Nutr. 16: 531, 1962.
- WELCH, R.M. & DARREL, R. VAN CAMPEN. Iron availability to rats from soybeans. J. Nutrition. 105: 253-256, 1975.
- WHEELER, E.L.; FINLEY, J.W. Lipoxigenase in the expressed juice of alfalfa leaves. J. Agric. Food Chem. 29(5): 912-914, 1981.
- WILLIAM STUDIER, F. Analysis of cacteroifage T-7 early RMA5 and protein on slab geles. J. Mol. Biol. 79: 237-243, 1973.
- WILSON, R.F. & TILLEY, J.M.A. Amino acid composition of lucerne and grass protein preparation. J. Sci. Food Agric. 16: 173. 1965.
- WOLF, J.W. Soybeans proteins - their functional chemical and physical properties. J. Agric. Food Chem. 18(6): 969-976, 1970.
- WOODHAM, A.A. The use animal test for the evaluation of leaf proteins concentrates. In: leaf protein: its agronomy, preparation, quality and use. I.B.P. Handbook N° 20. Blackwell Sci. Publ. PIRIE, N.W. Ed. London, England. p. 115-130, 1971.

YEOH, H.H. & CHEW, M.Y. Research in tapioca brief review. Mal. Agric. J. 49: 332-343, 1974. citado por MOJARRO, B.S. Tesis de Mestrado. CINVESTAV-IPN, México, D.F. México, p. 12, 1982.

YEOH, H.H. & CHEW, M.Y. Protein content and aminoacid composition of cassava leaf. Phytochemistry. 15(9): 1595-1599, 1976.