

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
CONCENTRADO PROTÉICO DE FOLHAS DE
MANDIOCA SUBMETIDO A DIFERENTES
TRATAMENTOS**

CLÁUDIA DE FÁTIMA MODESTI

2006

CLÁUDIA DE FÁTIMA MODESTI

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CONCENTRADO PROTÉICO
DE FOLHAS DE MANDIOCA SUBMETIDO A DIFERENTES
TRATAMENTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Modesti, Cláudia de Fátima

Obtenção e caracterização de concentrado protéico de folhas de
mandioca submetido a diferentes tratamentos/ Cláudia de Fátima Modesti
-- Lavras : UFLA, 2006.

73 p. : il.

Orientadora: Angelita Duarte Corrêa.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Folha de mandioca. 2. Concentrado protéico. 3. Digestibilidade.
4. Antinutriente. 5. Propriedade funcional. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-641.63682

CLÁUDIA DE FÁTIMA MODESTI

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CONCENTRADO PROTÉICO
DE FOLHAS DE MANDIOCA SUBMETIDO A DIFERENTES
TRATAMENTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2006

Prof. Dr. Carlos José Pimenta – UFLA

Profa. Dra. Ana Maria Dantas Barros – UFMG

Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

Aos meus pais, Luís Fernando e Maria da Graça, pelos valiosos ensinamentos que foram fundamentais para que eu nunca desistisse dos meus sonhos, pelo incentivo e amor.

Ao Guilherme, pela compreensão, estímulo, amor e por ter sempre acreditado que eu venceria mais essa etapa.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida e pela proteção.

À minha família e meu noivo, que sempre me apoiaram.

À profa. Angelita Duarte Corrêa, pelos excelentes ensinamentos, dedicação, apoio, carinho e amizade.

À profa. Celeste Maria Patto de Abreu, pela atenção e presteza como coordenadora da pós-graduação e também pelas contribuições a este trabalho.

Ao prof. Custódio Donizete dos Santos, pelas contribuições e atenção.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização do mestrado e à CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao prof. Ruy Carvalho, pelo apoio financeiro constante.

Aos professores das disciplinas cursadas, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

À EPAMIG, pela oportunidade de realização de testes em seu laboratório, em especial ao técnico de laboratório Samuel, pelo auxílio e atenção.

Aos alunos, Erasto Domingos de Oliveira, Luís Antônio Jária Barbosa e Flávia Cristina Almeida Marcos, bolsistas de iniciação científica, que me auxiliaram na execução deste trabalho, pela amizade e atenção.

Ao Antônio Rogério Teixeira, proprietário da Fazenda Rio Grande, pela gentileza em fornecer as folhas de mandioca, imprescindíveis para a execução deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Química, pela disponibilidade de seus laboratórios para a realização de análises e pela atenção.

Aos funcionários do Departamento de Química, em especial à Miriam e Maria Aparecida (Xulita), pela eficiência, presteza, atenção e amizade.

A todos os colegas de pós-graduação, em especial a Denise, Vanisse e Maráisa, pela amizade e colaboração.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

MUITO OBRIGADO

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE SIGLAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Aspectos gerais	3
2.2 Aspectos nutricionais das folhas de mandioca.....	5
2.3 Concentrado protéico de folhas	10
2.3.1 Obtenção do concentrado protéico de folhas	10
2.3.2 Extração de proteínas.....	12
2.3.3 Fatores que influenciam a extração e a precipitação.....	14
2.3.4 Folhas investigadas para a obtenção do concentrado protéico	16
2.4 Concentrado protéico de folhas de mandioca	17
2.5 Propriedades funcionais.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Colheita das folhas de mandioca	26
3.2 Preparo da farinha de folhas de mandioca	26
3.3 Obtenção do concentrado protéico de folhas de mandioca.....	26
3.4 Lavagem dos concentrados protéicos de folhas de mandioca.....	29
3.4.1 Com etanol e etanol 50%	29
3.4.2 Com éter etílico.....	29
3.4.3 Com acetona, mistura de acetona e hexano e hexano	30
3.4.4 Com etanol 50% à quente	30
3.5 Análises.....	31
3.5.1 Composição centesimal	31
3.5.2 Composição mineral	32
3.5.3 Polifenóis	33
3.5.4 Inibidor de tripsina.....	33
3.5.5 Saponina	33
3.5.6 Hemaglutinina.....	33
3.5.7 Cianeto.....	34

3.5.8 Digestibilidade protéica <i>in vitro</i>	34
3.5.9 Propriedades funcionais.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Obtenção do concentrado protéico de folhas de mandioca.....	36
4.2 Composição centesimal da farinha de folhas de mandioca, dos concentrados protéicos de folhas e dos resíduos fibrosos.....	40
4.3 Composição mineral.....	44
4.4 Lavagem dos concentrados protéicos de folhas de mandioca com vários solventes.....	488
4.5 Propriedades funcionais.....	555
5 CONCLUSÕES.....	63
6 PERSPECTIVAS.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE SIGLAS

CPF	concentrado protéico de folhas.
CPF_M	concentrado protéico de folhas de mandioca.
CPF_{MA}	concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido.
CPF_{MA}éter	concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido lavado com éter.
CPF_{MA}-OH	concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido lavado com etanol.
CPF_{MA}-OH50%	concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido lavado com etanol 50%.
CPF_{MC}	concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor.
CPF_{MC}Cac	concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor lavado com acetona.
CPF_{MC}Cac/hex	concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor lavado com uma mistura de acetona e hexano.
CPF_{MC}éter	concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor lavado com éter.
CPF_{MC}hex	concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor lavado com hexano.
CPF_{MC}-OH	concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor lavado com etanol.
CPF_{MC}-OH50%	concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado

	com calor lavado com etanol 50%.
CPFMC-OH50% quente 1x	concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor lavado com etanol 50% a quente.
CPFMC-OH50% quente 2x	concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor lavado duas vezes com etanol 50% a quente.
FDN	fibra detergente neutro.
FFM	farinha de folhas de mandioca.
MS	matéria seca.
PB	proteína bruta.
RF	resíduo fibroso.
RFA	resíduo fibroso da precipitação com ácido.
RFC	resíduo fibroso da precipitação com calor.
UTI	unidades de tripsina inibida.

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 01 Propriedades funcionais das proteínas exigidas por alguns alimentos	20
TABELA 02 Composição centesimal (g/100 g MS) ¹ da FFM, dos CPF e dos RF	40
TABELA 03 Rendimento de extração das proteínas de folhas de mandioca	43
TABELA 04 Teores de minerais da FFM, dos CPFM e dos RF	46
TABELA 05 Teores de proteína bruta e de digestibilidade protéica <i>in vitro</i> da FFM ^a dos CPFM ^b não lavados e dos lavados com vários solventes	50
TABELA 06 Teores de antinutrientes e digestibilidade protéica <i>in vitro</i> da FFM ^a , dos CPFM ^b lavados e não lavados e dos RF ^c	52
TABELA 07 Absorção de água e de óleo da FFM, CPFMC e do CPFMA	56
TABELA 08 Volume de espuma da FFM, do CPFMC e do CPFMA	59
TABELA 09 Estabilidade de emulsão da FFM, do CPFMC e do CPFMA	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 01 Fluxograma de obtenção do concentrado protéico de folhas	11
FIGURA 02 Esquema da extração de proteínas de folhas.....	13
FIGURA 03 Fluxograma de obtenção do concentrado protéico de folhas mandioca	28
FIGURA 04 Precipitação com calor (a) e precipitação com ácido (b)	38
FIGURA 05 Coloração dos concentrados protéicos de folhas de mandioca (CPFM) precipitados com calor (CPFMC) (a) com ácido (CPFMA) (j) e lavados com vários solventes.....	39
FIGURA 06 Solubilidade de nitrogênio em diferentes pH da farinha de folhas de mandioca (FFM), do concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor (CPFMC) e do concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido(CPMFA)	58

RESUMO

MODESTI, Cláudia de Fátima. **Obtenção e caracterização de concentrado protéico de folhas de mandioca submetido a diferentes tratamentos.** 2006. 73 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Em todo o mundo as diferenças sócio-econômicas restringem o acesso da população a proteínas de origem animal. As folhas de mandioca são pesquisadas para substituir alimentos convencionais, pois seu teor em proteínas, vitaminas e minerais é relativamente alto, além de seu baixo custo e disponibilidade. Todavia, devido ao teor elevado de fibras e a presença de substâncias antinutritivas, seu consumo direto fica limitado. A produção de concentrado protéico de folhas de mandioca (CPFMC) permite a utilização das proteínas das folhas com um reduzido teor de fibras e melhor qualidade protéica. Embora muitos desses concentrados ainda apresentem baixa digestibilidade protéica, são recomendados como ingrediente funcional em alimentos devido ao seu alto conteúdo de proteínas, perfil favorável de aminoácidos e de propriedades funcionais. Diante disso, neste trabalho analisou-se características físicas e químicas de CPFMC obtidos por diferentes formas de precipitação, calor e ácido, lavando-os e não lavando-os com vários solventes orgânicos, com a finalidade de encontrar um método que proporcionasse melhorias na qualidade protéica. Os CPFMC precipitados com calor (CPFMC) e com ácido (CPFMA), praticamente não apresentaram diferenças na composição centesimal. O nível de proteína do CPFMC aumentou 57,72% em comparação ao da farinha de folhas de mandioca (FFM) e também houve um aumento de extrato etéreo. Os rendimentos de extração das proteínas também foram semelhantes para os dois tipos de CPFMC. O teor de Fe dos CPFMC foi mais elevado quando comparado com o da FFM. As lavagens dos CPFMC com solução de etanol 50% e éter não acarretaram melhorias na digestibilidade protéica, apesar de ter reduzido os níveis de antinutrientes. Todavia, a lavagem com éter clareou a cor verde dos CPFMC. Os solventes que acarretaram um maior aumento na digestibilidade protéica foram a acetona e a mistura de acetona e hexano (1:1,5), que também proporcionaram um maior clareamento da cor verde do CPFMC. Em relação aos teores de cianeto, saponina e polifenóis dos CPFMC eles foram reduzidos quando comparados aos da FFM, exceto o do inibidor de tripsina. Não foi observada

¹ **Comitê Orientador:** Dra. Angelita Duarte Corrêa (Orientadora), Dra. Celeste Maria Patto de Abreu e Dr. Custódio Donizete dos Santos (co-orientadores)– DQI/UFLA.

atividade hemaglutinante em nenhuma amostra. A FFM apresentou absorção de água e de óleo bem mais elevada que os CPFM, já entre os tipos de CPFM os resultados foram semelhantes. A mínima solubilidade de nitrogênio da FFM e dos CPFM foi observada em pH entre 3 e 6. Verificou-se que a FFM possuiu uma capacidade de formação e estabilidade de espuma mais elevada que os CPFM. Tanto a FFM quanto os CPFM não apresentaram boa estabilidade de emulsão. A FFM poderia ser indicada para formulação de alguns tipos de alimentos, tais como, sopas, massas, produtos de padaria, bebidas carbonatadas, e os CPFM em sopas e molhos.

ABSTRACT

MODESTI, Cláudia de Fátima. **Obtention and characterization of cassava leaves protein concentrated with different treatments.** 2006. 73 p. Dissertation (Master in Agronomy, concentration area in Agrochemistry and Agrobiochemistry) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

All over the world the socioeconomic differences restrict population access to animal proteins. The cassava leaves are researched to substitute conventional foods, because its proteins, vitamins and minerals content are relatively high, besides its low cost and availability. However, due to the high content of fibers and the presence of antinutritive substances, its direct consumption is limited. The production of cassava leaves protein concentrated (CLPC) allows the use of cassava leaves proteins with reduced content of fibers and of better quality. Although many of those concentrates, yet, present low protein digestibility, they are recommended as functional ingredient in foods due to its high content of proteins, favorable profile of amino acids and of functional properties. This work investigated physical and chemical characteristics of CLPC produced by different forms of precipitation, heat and acid, washed and not washed with organic solvents, aiming at finding a method for improving the protein quality. CLPC precipitated with heat (CLPCH) and with acid (CLPCA) didn't presented significant differences in the centesimal composition. The levels of protein of CLPC increased 57.72% when compared to cassava leaves flour (CLF), presenting also higher lipid content. The yields of extraction of proteins were also similar for both types of CLPC. The CLPC Fe content was more elevated than that of CLF. The CLPC lavage with ethanol 50% and with ether didn't improve the protein digestibility; but reduced antinutrient levels. However, the ether lavage cleared CLPC green color. The solvents that improved protein digestibility were acetone and acetone-hexane mixture (1:1.5), that also cleared better the CLPCH green color. The levels of cyanide, saponin and polyphenol of CLPC were reduced when compared to CLF, except for the trypsin inhibitor. Hemagglutinin activity was not observed in any sample. The CLF presented absorption of water and oil higher than CLPC; however both types of CLPC showed similar results. The lowest nitrogen solubility of CLF and of CLPC was observed in pH between 3 and 6. It was verified that CLF possessed a foam formation and stability capacity higher than CLPC. The CLF and CLPC didn't present good emulsion stability. CLF could be indicated for

¹ **Guidance committee:** Dra. Angelita Duarte Corrêa (Adviser), Dra. Celeste Maria Patto de Abreu and Dr. Custódio Donizete dos Santos – DQI/UFLA.

formulation of some types of foods, such as, soups, masses, bakery products, carbonated beverage, and CLPC for soups and sauces formulation.

1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, as grandes diferenças sócio-econômicas restringem o acesso da população, com baixo poder aquisitivo, a proteínas de origem animal (leite, ovos, carne, etc.). A privação desses nutrientes acarreta uma carência protéica que compromete a saúde da população, em especial das crianças que se encontram em fase de desenvolvimento físico e mental.

As folhas verdes dos vegetais têm-se mostrado favoráveis para servirem como fonte de proteínas, constituindo, assim, uma alternativa alimentar no combate à desnutrição, tanto de maneira indireta, sob a forma de rações animais, que servirão de alimento para o homem, quanto diretamente na dieta humana. No Brasil, alguns pesquisadores têm estudado as folhas de mandioca, procurando uma possível alternativa para substituir alimentos convencionais, pois seu teor em proteínas, vitaminas e minerais é relativamente alto, quando comparado a hortaliças folhosas e grãos de cereais, além de apresentarem baixo custo e disponibilidade.

Todavia, devido ao teor elevado de fibras alimentares que não podem ser digeridas no estômago de humanos e de animais monogástricos e por fatores como a presença de substâncias antinutritivas e ou tóxicas, seu consumo direto fica limitado.

Muitos estudos têm sido realizados com as folhas de mandioca, com o objetivo de reduzir e ou eliminar esses fatores limitantes. Alguns deles comprovam a influência negativa de polifenóis sobre a digestibilidade da proteína, como o de Corrêa et al. (2004), que utilizaram diferentes solventes para a remoção de polifenóis e conseguiram reduzir consideravelmente esses níveis, melhorando a digestibilidade protéica. Outros trabalhos avaliando a forma de

secagem das folhas, a idade da planta e diferentes cultivares levaram à conclusão de que há uma grande influência desses fatores sobre os teores de nutrientes e antinutrientes.

Apesar das folhas de mandioca apresentarem um teor elevado em proteínas, a sua digestibilidade é baixa, devido provavelmente, ao seu alto teor de fibras e de polifenóis. A produção de concentrados protéicos de folhas (CPF) permite a utilização das proteínas foliares como alimento, contendo baixo teor de fibras e melhor qualidade nutritiva. Em muitas partes do mundo, a extração de proteínas de diversas plantas com a consequente obtenção de um concentrado protéico, praticamente sem fibras, vem sendo estudada. Todavia, muitos desses concentrados têm apresentado baixa digestibilidade protéica, que pode estar relacionada com aspectos de pós-colheita e, principalmente, com o método de precipitação das proteínas após a obtenção do suco verde das folhas, possivelmente com reações que podem ocorrer com os aminoácidos essenciais, tornando-os indisponíveis, ou com a ação de polifenóis e de outras substâncias que podem também interferir no aproveitamento nutricional.

O interesse na pesquisa por novas fontes protéicas não-convencionais, com o objetivo de estudar suas propriedades funcionais para aplicação na indústria alimentícia, é cada vez maior. O concentrado protéico de folhas de mandioca (CPFM) é uma dessas fontes, devido ao seu alto conteúdo de proteínas, perfil favorável de aminoácidos e propriedades funcionais. O CPFM tem se mostrado adequado como ingrediente funcional para a aplicação em diversos alimentos.

Diante disso, neste trabalho analisaram-se características físicas e químicas de CPFM obtidos por diferentes formas de precipitação, calor e ácido, lavando-os e não lavando-os com vários solventes orgânicos, possibilitando a redução de possíveis fatores antinutricionais, com a finalidade de encontrar um método que proporcionasse melhorias na qualidade protéica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta perene, arbustiva, pertencente à família Euphorbiaceae e ao gênero *Manihot*. Mandioca, aipim ou macaxeira são alguns de seus nomes comuns. É uma planta originária de regiões tropicais. No Brasil e no México se concentra a maior parte dessas espécies, sendo que, no primeiro, em todos os seus estados e durante quase todo o ano, a raiz da mandioca é colhida. Possui uma elevada importância social, uma vez que vem sendo usada como fonte de carboidratos para milhões de pessoas, em especial para os países em desenvolvimento (Lorezi & Dias, 1993).

É uma planta arbustiva com crescimento vertical. Algumas cultivares podem atingir cerca de 1m; outras podem alcançar 5m de altura. Suas folhas são palmadas, podendo variar em tamanho, coloração, número e forma de lóbulos. Geralmente elas contêm de cinco a sete lóbulos, mais ou menos estreitos e longos ou estrangulados (Lorezi & Dias, 1993).

Em geral, qualquer tipo de solo proporciona boas colheitas de mandioca, sendo mais propícios os que se apresentam com textura arenosa, boa aeração, bem drenado e com bom teor de matéria orgânica. Em solos argilosos também são obtidos bons rendimentos, porém, o desenvolvimento das raízes, bem como a sua colheita, torna-se dificultado, não sendo rara a perda e quebra das mesmas no campo. Além disso, possui características que facilitam sua difusão, pois se adapta a solos pobres, é resistente à seca e consegue sobreviver junto às ervas daninhas, e apresenta ampla adaptação às mais variadas condições climáticas, não necessitando de técnicas refinadas para sua cultura (Lorezi & Dias, 1993).

A queda das folhas é um fenômeno natural e normal nessa espécie, iniciando-se nas plantas ainda pequenas. Quando atingem o máximo de

desenvolvimento, iniciando-se a época fria (março-abril), as folhas caem, em geral na sua totalidade, até o mês de junho. A colheita da raiz de mandioca realiza-se no fim do primeiro ou do segundo ciclo vegetativo, quando a planta se encontra em repouso fisiológico. É nesse período, ao final de dois ciclos vegetativos, que as raízes apresentam melhor rendimento industrial (Lorezi & Dias, 1993). A determinação da época de colheita é um fator essencial no rendimento das cultivares. O desconhecimento do ciclo pode acarretar prejuízos aos produtores, pois, se a mandioca for colhida antes dessa época, ocorre perda de produtividade por ainda não ter atingido o máximo de acúmulo de matéria seca e, se colhida tardiamente, ocorre podridão radicular (Mendonça et al., 2003).

Segundo Ravindran (1993), a produtividade das folhas de mandioca varia consideravelmente, dependendo da cultivar, do solo, da fertilidade, da densidade de plantio, da idade da planta, da frequência da colheita e do clima. Alguns estudos têm demonstrado ser possível colher folhas de mandioca mantendo-se uma produtividade aceitável de raízes e aumentando-se a produtividade das folhas (Dahniya et. al., 1981; Ravindran & Rajaguru, 1988).

Existem duas variedades de mandioca: a mansa, que é a de mesa, apresentando um teor de HCN inferior a 50mg/kg e a brava, que apresenta um valor superior a 50mg/kg, variável de acordo com a cultivar e a idade da planta. As variedades com elevados teores de HCN são destinadas à fabricação de farinha, enquanto as que possuem baixos conteúdos deste ácido são consumidas cozidas, fritas, na forma de bolos e outras modalidades. As mandiocas mansas não são utilizadas na fabricação de farinhas, pois, originam um produto com sabor adocicado, de pouca aceitação no mercado (Lancaster et al., 1982; Mendonça et al., 2003).

Em alguns países da África (Zaire, Camarão, Guiné, Serra Leoa, Tanzânia e Gabão), as folhas de mandioca constituem uma parte significativa da

dieta. Em vários locais, são muito utilizadas na preparação de pratos regionais e também como hortaliças (Gidamis et al., 1993).

No Brasil, as regiões Norte e Nordeste destacam-se como as principais consumidoras, essencialmente na dieta alimentar, sendo suas folhas empregadas no combate à desnutrição, por meio da chamada “multimistura”. Trata-se de uma farinha composta de uma mistura de subprodutos alimentares, como farelo de trigo e arroz, fubá, casca de ovo, além de pós de folhas (mandioca, cenoura, taioba, abóbora) e de sementes de melão, gergelim, entre outros, dependendo da disponibilidade da matéria-prima. Na região Norte, são feitos pratos típicos como a maniçoba, utilizando-se folhas de mandioca trituradas e fervidas com água por vários dias. As folhas de mandioca fornecem um alimento rico em proteínas, vitaminas e minerais a baixo custo, todavia, são, na maioria das vezes desperdiçadas em todas as regiões brasileiras (Madruga & Câmara, 2000; Motta et al., 1994).

2.2 Aspectos nutricionais das folhas de mandioca

As folhas de mandioca são muito pesquisadas no Brasil (Aletor & Adeogun, 1995; Corrêa, 2004; Melo, 2005; Ortega-Flores, 2003; Salgado & Santos, 1986; Wobeto, 2003) e em diversos países (Fasuyi & Aletor, 2005; Fasuyi, 2005; Tangka, 2003), devido às suas características nutricionais.

As folhas de mandioca podem exercer um importante papel na nutrição humana e animal, uma vez que são fontes de proteínas. As proteínas desempenham várias funções nos processos biológicos, atuando, principalmente na formação e renovação de tecidos; por isso, sua deficiência pode causar sérios danos à saúde, especialmente em crianças. Teores elevados de proteínas das folhas de mandioca têm sido observados em vários trabalhos, com uma faixa variando de 20,77 a 35,9 g/100g MS (Madruga & Câmara, 2000; Ortega-Flores

et al., 2003; Wobeto, 2003; Corrêa et al., 2004; Melo, 2005). Esse teor de proteínas pode ser comparado ao de hortaliças convencionais, como a couve (30,84 g/100g MS) (Fonseca et al., 2002). Sagrilo et al. (2003) trabalhando com folhas de cinco cultivares de mandioca, secas a 45°C, observaram um decréscimo do teor de proteínas com a idade das plantas, ao determinar esse teor entre 12 e 21 meses. Alguns autores relatam uma deficiência dos aminoácidos sulfurados nas folhas de mandioca (Salgado & Santos, 1986; Ravindran & Ravindran, 1988), porém, Ortega-Flores et al. (2003) mostram, em seu trabalho, que ela não é deficiente em nenhum dos aminoácidos essenciais. Outros ainda mencionam que as folhas de mandioca possuem altos teores de lisina, possibilitando que atuem como suplementadoras, visando à obtenção de uma melhor qualidade protéica nas dietas (Carvalho & Kato, 1987).

Os teores de extrato etéreo e cinzas das folhas de mandioca variam entre cultivares. São encontrados, na literatura, teores na faixa de 3,30 a 16,00 g de extrato etéreo/100g MS (Aletor & Adeogun, 1995; Madruga & Câmara, 2000; Melo, 2005; Molina, 1989; Ortega-Flores et al., 2003; Ravindran & Ravindran, 1988; Rogers & Milner, 1963; Ross & Enriquez, 1969) e uma variação de 4,62 a 8,30 g de cinzas/100g MS (Aletor & Adeogun, 1995; Madruga & Câmara, 2000; Melo, 2005; Ortega-Flores et al., 2003; Rogers & Milner, 1963; Ross & Enriquez, 1969; Molina, 1989; Wobeto, 2003).

Foram relatados, em folhas de mandioca, teores de vitamina C de 43,64 a 257,64 mg/100g MS (Wobeto, 2003; Corrêa et al. 2004; Melo, 2005) e de beta-caroteno de 14,09 a 137,38 mg/100g MS (Wobeto, 2003; Corrêa et al. 2004; Melo, 2005), portanto, elas são consideradas fontes dessas vitaminas.

As folhas de mandioca são também ricas em minerais, especialmente Mg, Fe, Mn e Zn (Aletor & Adeogun, 1995; Aletor et al., 2002; Melo, 2005; Ravindran, 1993; Wobeto, 2003). Os minerais desempenham importantes funções nos organismos vivos, como o equilíbrio de íons nos líquidos

extracelulares, eletrólitos que participam do controle osmótico do metabolismo, catalizadores de certos sistemas enzimáticos e alguns ainda se encontram na dependência de vários sistemas (Franco, 2000). São encontrados, nas folhas de mandioca, teores de Mg variando de 0,16 a 0,35g/100g MS (Madruga & Câmara, 2000; Melo 2005; Wobeto, 2003) e de Fe de 105,77 a 225,60mg/kg MS (Melo, 2005; Wobeto, 2003), e para diferentes cultivares. O Mn apresentou teores de 50,30 a 333,69 mg/kg MS (Chavez et al., 2000; Melo, 2005; Wobeto, 2003) e o Zn de 4,05 a 91,89mg/kg MS (Chavez et al., 2000; Melo, 2005; Wobeto, 2003).

As folhas de mandioca apresentam um elevado teor de fibras, 26,50 a 35,40 g/100g MS (Corrêa et al., 2004; Melo, 2005; Reed et al., 1982) e também antinutrientes, como polifenóis, inibidor de tripsina, saponina, hemaglutinina e cianeto.

Os polifenóis podem interagir com as proteínas. Isso ocorre devido ao grande número de hidroxilas, que geram ligações de hidrogênio com as proteínas, formando complexos muito estáveis interferindo na extratibilidade e na digestibilidade protéica. Além disso, afetam a palatibilidade dos alimentos por acarretarem um sabor adstringente devido à sua habilidade de se ligar às proteínas da saliva e membranas da mucosa (Natividade, 1992; Ravindran, 1993). Wobeto (2003) verificou que os teores de polifenóis das folhas de mandioca aumentam com a maturidade do vegetal, tendo estudado plantas na idade de 12, 15 e 17 meses.

Padmaja (1989) obteve bons resultados para a redução dos teores de polifenóis das folhas de mandioca quando as secou à temperatura de 60°C e, em seguida, borrifou hidróxido de sódio, conseguindo reduzir de 95% a 98% de polifenóis. Já Corrêa et al. (2004), utilizando diferentes solventes (água, etanol e hidróxido de amônio), observaram uma redução de 64,87% a 94,23% de

polifenóis e um aumento da digestibilidade de 22,93% a 74,37%, dependendo do solvente usado.

Os inibidores de proteases são outro grupo de fatores antinutricionais que estão associados ao mecanismo de defesa das plantas, são capazes de inibir as atividades das enzimas tripsina, quimotripsina e carboxipeptidases. Sua presença na dieta pode levar à redução da taxa de crescimento de animais acompanhada por uma diminuição da digestibilidade protéica. O tratamento térmico é o mais eficiente dos métodos para reduzir ou eliminar ação destes inibidores, todavia, em isolados protéicos a sua estabilidade térmica pode ser maior (Genovese & Lajolo, 2000). São encontrados teores de inibidor de tripsina em folhas de mandioca variando de 0,57 a 11,14 UTI/mg MS (Corrêa et al., 2004; Wobeto, 2003).

As saponinas são glicosídeos que ocorrem em uma grande variedade de plantas e são caracterizadas pelo gosto amargo, capacidade de formar espuma em solução aquosa e por causarem, *in vitro*, a hemólise de eritrócitos. A classificação das saponinas geralmente é feita de acordo com o núcleo fundamental aglicona, podendo ser denominadas saponinas esteroidais ou saponinas triterpênicas. Sua ação lipofílica facilita a complexação das saponinas com esteróides, proteínas e fosfolipídeos das membranas celulares, alterando a permeabilidade das mesmas ou causando sua destruição (Schenkel et al., 1999). Wobeto (2003), em seu trabalho com folhas de mandioca, constatou que os menores teores de saponina foram encontrados aos doze meses de idade da planta (2,90 g/100g MS). No entanto, Melo (2005) encontrou 1,07 g/100g MS em uma cultivar diferente de mesma idade. Segundo o primeiro autor, esse teor se eleva de acordo com a maturidade do vegetal. As diferenças encontradas são inerentes à cultivar, à forma de secagem das folhas, entre outras.

As hemaglutininas ou lectinas são substâncias que têm a capacidade de aglutinar células do sangue. Essa aglutinação é consequência da união das

hemaglutininas com alguns componentes da membrana plasmática do eritrócito. Sua toxicidade pode ser eliminada pelo calor úmido (Fennema, 1993). Wobeto (2003) encontrou atividade hemaglutinante nas folhas de mandioca até a primeira diluição na base 2 (2^1), no entanto, Melo (2005) detectou até a segunda diluição na base 2 (2^2), mas as cultivares eram diferentes.

Os compostos cianogênicos são compostos orgânicos que originam, por hidrólise, o ácido cianídrico, que pode inviabilizar o consumo, tanto na alimentação humana quanto na animal. As propriedades tóxicas associadas com as folhas frescas devem-se à ação enzimática da linamarina quando a integridade física da planta é danificada. Ravindran & Ravindran (1988) encontraram um teor de 780 mg/100g MS em folhas maduras de mandioca quando secas inicialmente ao sol, e em seguida, colocadas à temperatura de 60°C em estufa por 24 horas. Todavia, vários autores conseguiram uma redução do cianeto das folhas de mandioca mais eficiente com o processo de secagem à sombra (Corrêa et al., 2002; Madruga & Câmara, 2000). Wobeto (2003) encontrou um percentual de perdas de cianeto que variou de 62,09% a 80,16%, em folhas de mandioca secas à sombra, para várias cultivares.

A composição química dos vegetais e, particularmente, a da mandioca sofrem influência varietal, da época de colheita, das condições climáticas e dos tratamentos culturais. Wobeto (2003), estudando alguns constituintes em folhas de mandioca em três idades da planta, aos 12 meses, 15 meses e 17 meses, observou níveis mais elevados para alguns nutrientes e mais baixos para a maioria dos antinutrientes, aos 12 meses.

2.3 Concentrado protéico de folhas

2.3.1 Obtenção do concentrado protéico de folhas

A maior preocupação, relacionada à nutrição humana e animal, tem sido encontrar fontes alternativas, devido ao alto custo dos principais alimentos fornecedores de proteínas. Fontes não convencionais têm sido pesquisadas, visando obter alimentos de boa qualidade e acessível a todos os consumidores.

Vários procedimentos têm sido descritos pela literatura para a obtenção de concentrado protéico de folhas (CPF). Em geral, os processos consistem, basicamente, de uma extração utilizando-se uma solução extratora combinada com uma operação mecânica que provoca a ruptura celular e a liberação dos nutrientes solúveis, produzindo um suco verde e um resíduo fibroso. O resíduo fibroso é separado do suco verde por meio de métodos convencionais de filtração ou prensagem. A próxima etapa é a de precipitação do suco, seguida de centrifugação, obtendo-se o sobrenadante e o CPF e finalizando com a desidratação, conforme ilustrado na Figura 1.

Os métodos de precipitação mais utilizados, segundo a literatura são os que empregam ácidos ou aquecimento. Há outras diferentes técnicas como a fermentação, o uso de floculantes ou a redução da constante dielétrica por meio da adição de solventes orgânicos tais como acetona, etanol, butanol ou éter (Heinemann et al., 1998; Oshima & Ueda, 1984; Szymczyk et al., 1995). Espíndola (1987) observou que o método de coagulação por calor foi mais eficiente em seu trabalho que o por fermentação.

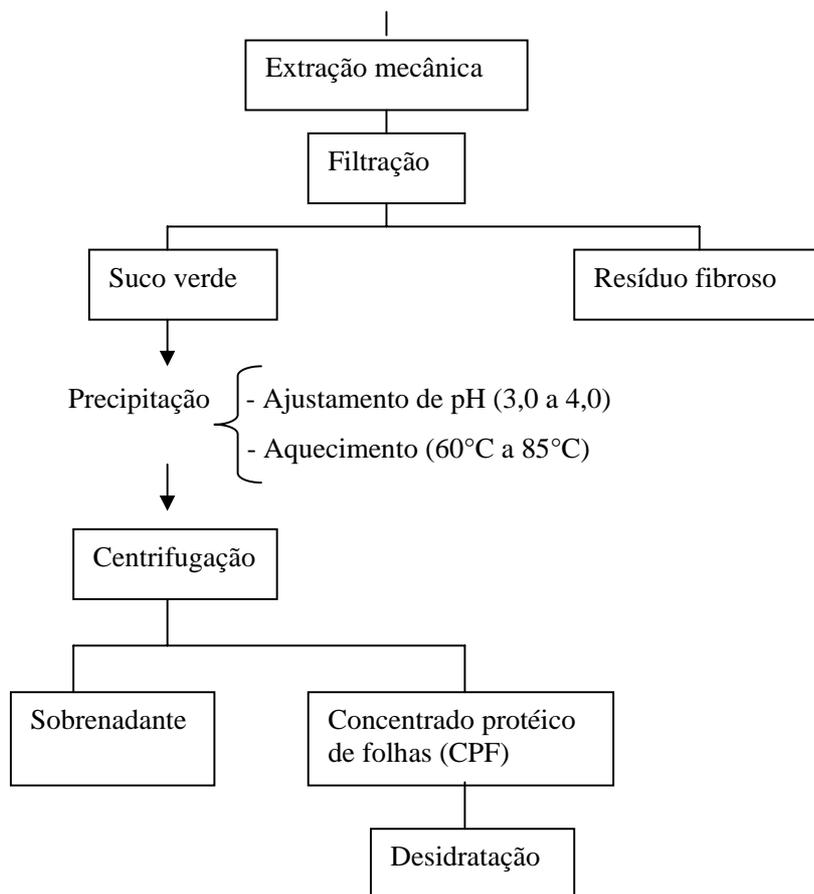


FIGURA 1 Fluxograma de obtenção do concentrado protéico de folhas

O emprego da tecnologia de membranas (ultrafiltração/diafiltração) permite a separação e a concentração de proteínas. Molina (1989) empregou a essa técnica para a obtenção de CPFM e pôde verificar maior rendimento na recuperação de proteínas e maior digestibilidade em comparação com a termocoagulação. D'Alvise et al. (2000) empregaram a hidrólise enzimática e a

ultrafiltração em uma planta piloto em larga escala para seu estudo com CPF de alfafa, gerando um produto de boa qualidade, porém, de elevado custo. Koschuh et al. (2004), estudando a produção de CPF, observaram que ambas, a coagulação por calor e a ultrafiltração, tiveram alguns resultados semelhantes para o CPF de alfafa, como foi o caso do teor de proteína.

Para a obtenção do precipitado realiza-se uma centrifugação ou flotação. A etapa final é a de desidratação, constituindo assim o produto denominado CPF. Para isso podem ser empregadas diferentes técnicas e uma delas é a utilização de lâmpadas de infravermelho a 55°C (Szymczyk et al., 1995).

A circulação de ar quente pode ser outro método, no entanto, produz um escurecimento intenso, devido à transformação da clorofila em feofitina e reações de Maillard. A secagem por liofilização é mais recomendada por não causar escurecimento ou redução do valor e das propriedades funcionais das proteínas, todavia, industrialmente, é uma técnica de alto custo (Hernández et al., 1998).

2.3.2 Extração de proteínas

A extração das proteínas de folhas dependerá, em grande parte, do grau de desintegração celular, que afeta a quantidade de proteína que se obtém durante o processo. Isso porque, quanto maior for o rompimento, maior a destruição do material das paredes das células e, conseqüentemente, maior quantidade de proteínas serão obtidas no suco (Pirie, 1987). Para isso é necessário que haja a sua exposição a um extrator mecânico, que provocará o rompimento das paredes celulares do vegetal, através de corte, impacto, aplicação de pressão diferencial, pela combinação desses três ou, ainda, por equipamentos que se baseiam em uma prensa de parafuso, aumentando a fricção e facilitando a desintegração das folhas. Os subprodutos da extração, com suas

respectivas composições e aplicações, podem ser visualizadas através do esquema da Figura 2.

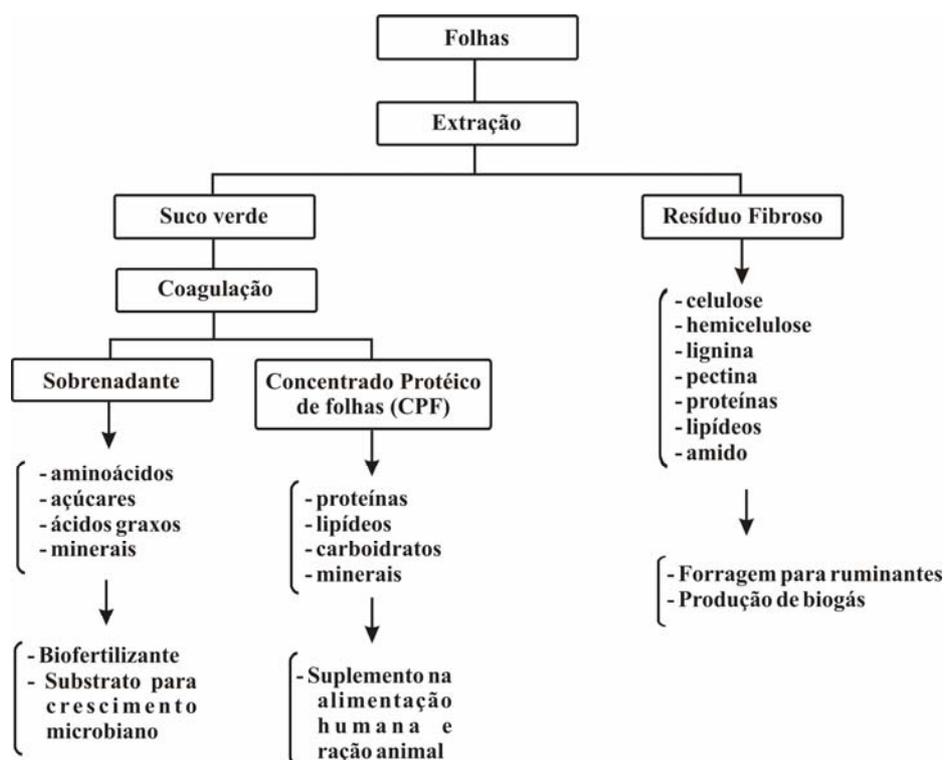


FIGURA 2 Esquema da extração de proteínas de folhas (Espíndola, 1987).

Podem ser utilizados, como agentes de extração, tanto a água quanto soluções moderadamente alcalinas (Derenzo & Aldeia, 2000). Urribarrí et al. (2004), por exemplo, utilizaram hidróxido de cálcio em seu trabalho, uma solução não muito comum na literatura, obtendo como rendimento máximo de

extração, 11,70 % para capim-elefante em pH 12,6. Com relação à eficiência das soluções extratoras, Medeiros et al. (1999), trabalhando com folhas de aguapé, observaram que uma solução de NaOH 0,05N foi mais eficiente que a água para promover a extração das proteínas.

A extração e a utilização de proteínas de folhas têm sido amplamente estudadas na Europa, América e Ásia (Aletor et al., 2002).

2.3.3 Fatores que influenciam a extração e a precipitação

Entre os fatores que interferem na extratibilidade e no rendimento de extração podem-se destacar a idade da planta, a relação proteína/fibra do vegetal, o equipamento empregado para realizar o rompimento celular, a composição do agente extrator, o tempo e a temperatura de extração (Espíndola, 1987; Derenzo & Aldeia, 2000; Urribarrí et al., 2004).

Durante as etapas de extração e precipitação, é de fundamental importância controlar alguns fatores para que não ocorram alterações nas características e no rendimento dos CPF.

A manipulação das folhas durante e após a colheita, a utilização de um equipamento adequado durante o processo de extração e, logo em seguida, a coagulação das proteínas do suco verde são procedimentos que devem ser realizados o mais rápido possível. Isso é importante para aumentar a eficácia e reduzir o tempo do processo, uma vez que, ao romper as estruturas celulares, são liberadas enzimas de ação proteolíticas e lipoxidases, comprometendo a qualidade do CPF (Espíndola, 1987). Também são liberadas, juntamente com as proteínas algumas substâncias, como os polifenóis, que reagem com as mesmas formando complexos insolúveis, diminuindo a extratibilidade das proteínas (Derenzo & Aldeia, 2000; Pirie, 1987). Há uma estimativa de que ocorra ligação entre proteínas-polifenóis e proteínas-carboidratos durante a preparação

do CPF, influenciando a digestibilidade protéica. Entre alguns fatores principais nessas ligações, podem-se destacar: o tempo, as condições de processamento da planta e, dependendo da concentração de polifenóis podem prejudicar completamente a extração das proteínas das folhas (Pirie, 1978)

A literatura sugere um pH inferior a 6 para precipitação, pois o ponto isoelétrico das proteínas de folhas está compreendido entre 3 e 5. Para valores de pH próximos ao seu ponto isoelétrico, as moléculas protéicas se manifestam com um mínimo de interações com a água e suas cargas e assim podem surgir agregados e conduzir a uma precipitação. Uma alteração no pH pode significar alterações no rendimento e na própria precipitação das proteínas, causando interferências na formação do coágulo. Chaves (1987) observou um bom rendimento protéico de folhas de mandioca com um pH entre 8 e 9 durante a extração, concluindo que essa seria uma faixa de pH adequada para a extração. Durante a precipitação das proteínas, para as mesmas condições de temperatura e tempo de trabalho, o pH exerce um notável efeito na qualidade e quantidade das mesmas (Natividade, 1992).

O processamento térmico durante a preparação dos CPF pode contribuir para um aumento da digestibilidade das proteínas foliares acompanhada de uma redução das substâncias antinutritivas. Temperaturas entre 75°C e 80°C para precipitação são recomendadas, pois, acima dessa faixa podem comprometer o valor nutritivo do CPF. Temperaturas acima de 100°C, além de causar danos à proteína, podem tornar a lisina totalmente indisponível (Natividade, 1992).

Medeiros et al. (1999) também testaram a precipitação da proteína de folhas de aguapé com e sem aquecimento a pH 3,5, observando que, com aquecimento, obteve-se um coágulo com melhor textura e facilidade de filtração que naquele obtido exclusivamente por acidificação. Urribarrí et al. (2004) utilizando uma solução de hidróxido de cálcio a um pH igual a 10 e temperatura de 60°C para a extração das proteínas de capim-elefante verificaram que a

concentração de proteínas solúveis foi a mesma para todos os intervalos de tempo aplicados.

Estudando as condições operacionais da etapa de extração de proteína de folhas de capim-elefante, Derenzo & Aldeia (2000) avaliaram a eficiência de extração em diferentes pH a temperatura de 40°C e concluíram que um aumento no pH inicial aumentou a eficiência da extração. No entanto, em outro ensaio em que estudaram o efeito da temperatura no rendimento de extração com pH inicial igual a 10, verificaram-se que, entre 40°C e 65°C, houve uma pequena variação na eficiência de extração, de 73% a 78%.

2.3.4 Folhas investigadas para a obtenção do concentrado protéico

Várias leguminosas tropicais foram investigadas no Brasil para a obtenção de concentrado protéico de folhas (CPF), como *Calopogonium muconoides* Desv. (calopogônio), *Cajanus cajan* (feijão-gandu), *Canavalia ensiformes* L. (feijão-de-porco), *Desmodium discolor* Voy (marmelada-de-cavalo), *Dolichos lab lab* L. (labe-labe), *Stizolobium aterrimum* Piper e Tracv. (mucuna-preta), *Vigna luteola* (Jaq.) Benth (vigna) e *Indigofera erecta* Bth. (Corrêa et al., 1989 e 1989 a Dantas-Barros, 1984; Espíndola, 1987).

Além de leguminosas, outras folhas de plantas tropicais também foram estudadas: capim napier, aguapé, taioba, amaranto, couve, mostarda, beterraba, cenoura, batata-doce, mandioca, ora-pro-nobis e cana-de-açúcar (Corrêa et al., 1989 e 1989a; Carlsson et al., 1984; Corrêa & Espíndola, 1986; Espíndola, 1987; Natividade, 1992; Vieira, 1983).

Cada vez mais surgem pesquisas em todo o mundo visando ao melhoramento das técnicas para a obtenção de CPF com alta qualidade e rendimento (Aletor et al., 2002; D'Alvise et al., 2000; Fasuyi, 2005; Henandez et al., 1998; Koschuh et al., 2004; Szymczyk et al., 1995; Tangka, 2003;

Urribarrí et al., 2004). Os CPF de alfafa são manufaturados em escala comercial na França, EUA, Hungria e Dinamarca, aplicados, na maioria das vezes na alimentação animal (D'Alvise et al., 2000).

2.4 Concentrado protéico de folhas de mandioca

Como já mencionado, as folhas de mandioca, apesar de apresentarem um elevado teor em proteínas, têm digestibilidade relativamente baixa, provavelmente devido às fibras e polifenóis. Assim, uma das formas de se melhorar a qualidade protéica das folhas de mandioca seria a produção de um concentrado protéico, que removeria as fibras e reduziria os polifenóis, trazendo melhorias na digestibilidade. Além disso, outros fatores antinutricionais que também comprometem o aproveitamento das folhas poderiam ser igualmente reduzidos.

De acordo com dados da literatura, os concentrados protéicos de folhas de mandioca (CPFM) apresentam uma quantidade e um rendimento protéicos que podem ser considerados elevados quando comparados a outros tipos já produzidos.

Salgado & Santos (1986) testaram quatro métodos para a obtenção de CPFM, e em todos utilizaram a água para a extração das proteínas e um liquidificador industrial. No primeiro método, ajustaram o pH a 7, com uma solução de NaOH; em seguida, reduziram o pH a 4 com uma solução de HCl, não havendo centrifugação. No segundo, não ajustaram o pH, precipitaram com calor entre 60°C e 65°C e não centrifugaram; no terceiro, repetiram o primeiro método, porém, centrifugando por cinco vezes com água deionizada. No último método, repetiram o segundo, porém, centrifugando cinco vezes com água deionizada. Observaram uma maior porcentagem de proteína no último método (40,72g/100g MS) e atribuíram essa maior porcentagem às sucessivas lavagens

do precipitado com água deionizada, pois, provavelmente essas lavagens removeram impurezas e concentraram proteínas. Todavia, o segundo método foi escolhido para estudo, com um teor de proteína um pouco menor (35,68g/100g MS), pois foi considerado mais simples e de mais rápida execução.

Chaves (1987), em seu trabalho de CPFM, extraiu as proteínas das folhas de mandioca utilizando uma máquina de moer carne e uma solução de hidróxido de sódio 0,05N. Ele utilizou vários métodos para a precipitação das proteínas, nos quais observou maior rendimento na autocoagulação por 5 dias (71,5%) em comparação com a precipitação com ácido em pH 3,0 (56,6%), com calor a 85°C, por 5 minutos (51,8%) e com etanol a 23% (61,7%). Ele também testou o uso do CPFM como complemento de ração de frangos, concluindo que, de 7% a 10% de peso da soja usada para fabricação de ração poderiam ser substituídos pelo CPFM, podendo seu resíduo fibroso substituir rações comerciais para coelhos. O resíduo fibroso resultante da produção de CPF também pode ser utilizado na alimentação de ruminantes, pois recupera uma fração considerável da matéria seca e de proteína das folhas.

Já Molina (1989), ao extrair as proteínas das folhas de mandioca, variedade PAN-MEX 51, usando um liquidificador para a extração mecânica e uma solução de NaOH, observou uma considerável digestibilidade do CPFM obtido por ultrafiltração (85%) e por redução do pH até 3,5, seguido de aquecimento a 85°C (80%). Este autor atribuiu o aumento da digestibilidade do CPFM ultrafiltrado em comparação ao termocoagulado à eliminação de polifenóis durante a técnica de ultrafiltração. Ele observou que os CPFM estudados apresentaram propriedades funcionais atrativas em relação à capacidade de absorver água, gordura e propriedades emulsificantes, podendo ser utilizado na formulação de alguns tipos de alimentos como sopas, carnes e produtos de padaria. Porém, não foram promissores no que se refere às propriedades de espumabilidade.

O CPFM pode ser incorporado a diversos alimentos habituais. Heinemann et al. (1998), por exemplo, pesquisaram misturas feitas à base de farinha de trigo e CPFM visando aumentar a qualidade nutricional dessa farinha. Para a obtenção do CPFM, eles utilizaram hidróxido de sódio 0,1N para a extração e, para a precipitação, o método da fermentação natural por cinco dias. Em seus ensaios com animais observaram um aumento do consumo quando adicionaram 10% de CPFM à farinha de trigo, concluindo que o sabor do CPFM não interferiu na sua aceitação.

Entre várias folhas verdes usadas para a obtenção de CPF, Tangka (2003) observou que o mais rico extrato foi o de mandioca, com um teor de 45,68 g/100g de proteína enquanto que o de outras variou de 36,42 a 39,64 g/100g. Contudo, Fasuyi (2005) concluiu que o CPFM não deve ser incorporado como única fonte de proteínas à dieta para humanos e animais, que deve ser suplementada com outras fontes protéicas.

Foi constatado que o CPFM possui uma quantidade razoável de aminoácidos essenciais e, devido ao seu alto conteúdo em lisina poderia suplementar alguns alimentos que possuem deficiência nesse aminoácido, como é o caso dos cereais. Esse mesmo CPFM mostrou-se com alto valor nutritivo, com uma produção de baixo custo e bem simplificada, podendo, assim, ser muito atrativo como fonte de proteína na produção de alimentos e também na alimentação animal (Fasuyi & Aletor, 2005).

2.5 Propriedades funcionais

As propriedades funcionais são aplicadas aos ingredientes dos alimentos e podem ser definidas como propriedades físico-químicas que colaboram para que os alimentos tenham as características almejadas para sua aceitação e utilização pelo consumidor. Algumas que são de fundamental importância para a

maioria das aplicações industriais estão apresentadas na Tabela 1. Elas fornecem informações sobre o comportamento de uma proteína em um sistema de alimentos, determinando o campo de aplicação de um novo ingrediente protéico na indústria. As propriedades funcionais refletem a completa interação entre composição, estrutura, conformação e propriedades físico-químicas das proteínas, e também a interação destas com outros componentes do alimento (lipídeos, carboidratos, etc.). Essas propriedades podem alterar o comportamento físico durante a preparação e processamento dos alimentos. Elas não são independentes, mas, interagem umas com as outras (Cheftel et al., 1989; Farfán, 1990; Fennema, 1993).

TABELA 1 Propriedades funcionais das proteínas exigidas por alguns alimentos.

Alimentos	Funcionalidade exigida
Bebidas	Solubilidade em diferentes pH, viscosidade
Sopas	Emulsificação, viscosidade, retenção de água
Produtos de padaria (formação de massa)	Absorção de água, emulsificação, formação de espuma
Alimentos substitutos da carne (ex.: proteínas vegetais texturizadas)	Absorção de água, insolubilidade

Fonte: Fennema, 1993.

Para avaliar as propriedades funcionais de uma proteína o mais recomendado é fazer uma determinação experimental e não apenas se basear em suas características estruturais, pois, dessa forma, pode-se levar a uma conclusão

equivocada. A maior parte dos ingredientes protéicos utilizados pela indústria de alimentos se constitui em misturas de proteína contendo carboidratos, lipídeos, polifenóis, etc. As propriedades funcionais podem ser modificadas por agentes físicos, químicos e biológicos, tipo de extração empregado e condições de secagem das proteínas. A maior dificuldade para avaliar uma proteína está na falta de uma padronização das metodologias utilizadas para determinação dessas propriedades, ficando complicada a comparação dos resultados com a literatura (Cheftel et al., 1989; Farfán, 1990; Fennema, 1993; Sgarbieri, 1996).

As propriedades funcionais podem ser classificadas de acordo com as propriedades físico-químicas. Uma delas é a propriedade de hidratação que pode ser exemplificada pela absorção de água. A proteína pode agir como agente hidratante devido à associação de seus grupos com substâncias polares e possivelmente, as cadeias laterais não polares contribuem para a absorção de óleo. Essa absorção desempenha um importante papel na textura, maciez e suculência de diversos alimentos, principalmente em carnes, salsichas e massas, colaborando para uma consistência e viscosidade convenientes. A absorção de água é uma propriedade com grande interesse prático para os concentrados protéicos, uma vez que são hidratados antes de serem utilizados. O aumento na absorção de água em certos produtos, como os de padaria, é benéfico, na maioria das vezes, em termos de rendimento, pois se consegue fazer mais massa com a mesma quantidade de farinha. Porém, um aumento excessivo pode prejudicar a massa, deixando-a pegajosa e, assim, dificultando seu manuseio (Beuchat, 1977; El-Dash et al., 1994; Fennema, 1993; Pollonio, 1988; Sgarbieri, 1996).

Alguns fatores, como temperatura, pH, concentração protéica, força iônica e a presença de outros componentes, afetam a interação proteína-proteína e proteína-água. O pH influencia a absorção de água pela alteração da carga líquida da proteína, que determina forças interativas de atração e repulsão e sua capacidade de associar com a água (Beuchat, 1977; Fennema, 1993; Pollonio,

1988). No ponto isoelétrico, a hidratação das proteínas é mínima, pois, a interação proteína-proteína neste ponto é máxima. Já o aquecimento provoca uma agregação, reduzindo a área superficial e o número de grupos polares disponíveis para fixar a água, diminuindo sua absorção (Fennema, 1993; Sangronis et al., 2004). Os CPFM podem ser incorporados na formulação de alimentos viscosos como as sopas, devido ao seu alto valor de absorção de água (Fasuyi & Aletor, 2005).

A solubilidade é outra propriedade de hidratação e, para um concentrado protéico, ela pode ser definida como a proporção de nitrogênio que é determinada após um procedimento específico (Beuchat, 1977). A solubilidade depende de determinados fatores, tais como pH, temperatura, tipo de proteína, tamanho da partícula, força iônica, temperatura e tempo de extração, concentração da proteína e outros componentes, como lipídeos, carboidratos e agentes redutores. Uma das vantagens de se conhecer as características dessa solubilidade é poder determinar as melhores condições de extração e purificação de proteínas. O grau de solubilidade é, provavelmente, a medida mais prática de desnaturação e agregação de uma proteína, visto que, estando parcialmente agregadas são pouco eficazes em processos de emulsificação ou formação de espuma. Para os estágios de preparação e processamento de um ingrediente protéico, é muito comum avaliar, primeiramente, a solubilidade protéica de um ingrediente. Uma alta solubilidade das proteínas admitia uma alta e rápida dispersão das partículas protéicas, o que permite formar sistemas coloidais de textura fina, sendo importante para a formação de espuma e também facilita a difusão da proteína pela interfase água, ar ou água e óleo (Fennema, 1993; Pollonio, 1988; Sangronis et al., 2004; Sathe & Salunkhe, 1981; Sgarbieri, 1996). Ela é importante na formulação de produtos ácidos, como bebidas carbonatadas ricas em proteínas e uma alta solubilidade em pH alcalino é

importante na produção de massas, sopas, produtos de padaria e confeitaria (Oshodi & Ekperigin, 1989).

Quando as proteínas estão em presença de outros constituintes, como fibras, fitatos ou lipídeos, tanto a sua solubilidade quanto outras propriedades funcionais são alteradas assim como tratamento térmico, tamanho da partícula e a força centrífuga empregada no método (Pollonio, 1988; Sangronis et al., 2004; Sathe & Salunkhe, 1981).

As propriedades funcionais também podem ser classificadas como propriedades de superfície, nas quais está incluída a formação de espuma. As espumas alimentícias podem ser definidas como dispersões de glóbulos de gás separadas por uma fase contínua, líquida ou semi-sólida, que contém um agente com atividade de superfície solúvel. Geralmente, o gás é o ar e a fase contínua é composta por uma suspensão aquosa de proteínas que reduz a tensão superficial entre o ar e o líquido, facilitando a deformação do segundo e assim se formam filmes estruturais em volta das gotículas de ar, prendendo-o e formando bolhas. Os glóbulos de ar são separados por uma fina camada de líquido chamada de lamela, formando uma interface gás-líquido e resultando em um filme adsorvido nessa região, prevenindo contra a coalescência dos glóbulos de ar. Os glóbulos de ar podem diferir em volume, dependendo da tensão superficial e da viscosidade da fase líquida. A capacidade de uma proteína em formar espuma refere-se à expansão de volume da dispersão protéica com a incorporação de ar por batimento ou agitação. Uma distribuição uniforme desses glóbulos de gás pode contribuir para a suavidade dos alimentos e aumentar a perceptibilidade dos aromas. Aquecimentos moderados de 70°C a 80°C podem melhorar as propriedades espumantes, aumentar o percentual de volume, porém, podem reduzir a estabilidade. Já aquecimentos mais intensos afetam a capacidade de formação de espuma; na espuma formada, o calor provoca a expansão de ar e a diminuição da viscosidade, resultando em colapso dos glóbulos de ar. O tempo e

a velocidade de agitação são fundamentais para a formação de uma espuma adequada, pois, uma agitação excessiva pode diminuir a estabilidade da espuma. Essas propriedades de superfície dependem da natureza da proteína, da solubilidade e do estado de desnaturação da proteína. A clara do ovo é muito sensível ao excesso de agitação; se houver um mistura acima de 6 a 8 minutos ocorre uma coagulação da proteína na interface ar-água, resultando em uma baixa estabilidade. As propriedades de espuma são influenciadas pelo pH da mesma forma que em outras propriedades, isto é, pela alteração na carga elétrica das moléculas de proteínas. A formação de espuma e emulsão estão envolvidas com diversos graus de agregação e insolubilidade das proteínas. As propriedades espumantes são importantes para a preparação de bolos, suspiros, merengues, mousses, entre outros (Cheftel et al., 1989; Fennema, 1993; Glória & Regitano-d'Arce, 2000; Pollonio, 1988; Sgarbieri, 1996). Segundo Fasuyi & Aletor (2005), as FFM podem ser incorporadas na formulação desse tipo de alimento.

Como propriedade de superfície também está incluída a emulsão. Uma emulsão pode ser definida como sendo um sistema com duas fases líquidas imiscíveis, dispersas uma na outra, em forma de pequenas gotas. A capacidade de uma proteína para formar emulsões depende da diminuição da tensão interfacial dos componentes hidrofílicos e hidrofóbicos dos alimentos. Elas atuam como agentes emulsificantes, devido à capacidade de reduzir a tensão superficial entre dois líquidos imiscíveis, tornando possível a mistura dos dois. Proteínas formam filmes em torno dos glóbulos de óleo, com força mecânica resistente à ruptura. Apenas a redução da tensão superficial não é suficiente para garantir a estabilidade de uma emulsão formada, pois ela depende da maleabilidade do filme protéico adsorvido na interface. Quanto mais hidrofóbica a proteína maior a concentração de proteína na interface e menor a tensão superficial, sendo mais estável a emulsão e maior quantidade de óleo é absorvido. A estabilidade de emulsão mede a capacidade das proteínas de

manter a mistura em uma força homogênea, quando submetida à ação de uma força ou calor. A absorção de óleo parece reduzir com o aumento da temperatura, possivelmente devido à diminuição da viscosidade do óleo. Alguns fatores que influenciam na emulsificação são pH, temperatura, quantidade tipo de proteína e desenho do equipamento, características do óleo e propriedades emulsificantes da proteína. As emulsões e os agentes emulsificadores apresentam grande importância para a indústria de alimentos especialmente em maionese, manteiga e produtos cárneos (Beuchat, 1977; Fennema, 1993; Sgarbieri, 1996).

A solubilidade de uma proteína está relacionada com sua capacidade de emulsificação e estabilidade de emulsão formada. Dados da literatura mostram conflitos em relação às boas condições das proteínas no seu ponto isoelétrico para desenvolver suas propriedades emulsificantes. Tratamentos térmicos utilizados em isolados protéicos levaram à desnaturação de proteínas solúveis ocasionando uma diminuição da viscosidade e da rigidez da película protetora adsorvida na interface, provocando uma redução na capacidade de emulsão. A dificuldade de se padronizar as condições para se obter as características de uma emulsão está associada à influência de diversos fatores, como pH, temperatura, tipo e geometria de aparelho utilizado, velocidade de adição de óleo e propriedades emulsificantes das proteínas. Esta propriedade é importante na preparação de sopas, sorvetes, cremes e patês (Fennema, 1993; Okezie & Bello, 1988; Pollonio, 1988).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Colheita das folhas de mandioca

As folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz, cultivar Pão da China), maduras e frescas, cultivadas na região de Lavras, MG, foram colhidas pela manhã, em três repetições, no mês de janeiro (aos nove meses após o plantio) e transportadas rapidamente em sacos plásticos para o Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da UFLA. Parte das folhas foi utilizada para a determinação das análises de cianeto e umidade, uma outra parte foi destinada à produção de farinha de folhas de mandioca (FFM), e as folhas restantes para a obtenção do concentrado protéico de folhas (CPFM).

3.2 Preparo da farinha de folhas de mandioca

As folhas de mandioca foram lavadas com água corrente e destilada, colocadas para secar à sombra, em bandejas de papel, em recinto fechado e arejado, à temperatura ambiente, por seis dias. Após, foram levadas à estufa a 30°C, por quatro horas, sem os pecíolos, trituradas em moinho e armazenadas em frascos hermeticamente fechados.

3.3 Obtenção do concentrado protéico de folhas de mandioca

As folhas de mandioca foram lavadas com água corrente e destilada, colocadas para escorrer e pesadas. Em seguida, foram picadas e trituradas em um liquidificador com uma solução extratora (especificadas no próximo parágrafo), em velocidade máxima, por 2 minutos. Dessa forma, obteve-se um homogenato que foi filtrado em tecido de algodão, separando o suco verde do

resíduo fibroso (RF). Este resíduo foi submetido a uma reextração, nas mesmas condições. O RF foi colocado sobre um papel, seco em estufa ventilada em temperatura de $\pm 36^{\circ}\text{C}$, triturado em gral e armazenado em frascos hermeticamente fechados. O suco verde da reextração foi reunido com o primeiro, sendo registrados seu pH e sua temperatura. Em seguida, foi levado ao banho-maria a 80°C , por 15 minutos, e o precipitado formado foi resfriado em banho de gelo. Esse precipitado foi denominado concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor (CPFMC). Uma segunda extração das proteínas foi feita nas mesmas condições, diferindo apenas na forma de precipitação, na qual empregou-se HCl concentrado, abaixando o pH até 4,0 com uso do pHmetro sob agitação constante e em seguida, deixado em repouso. O precipitado formado foi denominado concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido (CPFMA). Esses processos de extrações foram realizados em três repetições. Em seguida, os CPFM foram centrifugados, a 1863 g por 15 minutos, seus sobrenadantes descartados, os CPFM congelados em freezer e liofilizados até peso constante. Após, foram triturados em gral, separados em porções que foram lavadas com vários solventes orgânicos. O fluxograma da Figura 3 ilustra o processo de obtenção do concentrado protéico de folhas de mandioca.

Foram testadas três soluções extratoras:

- 1) solução de hidróxido de sódio 0,05N na proporção de 1:4 p/v, contendo metabissulfito de sódio (5 mg de metabissulfito/100mL);
- 2) solução de hidróxido de sódio 0,01N na proporção de 1:4 p/v, contendo metabissulfito de sódio (5 mg de metabissulfito/100mL);
- 3) água destilada, contendo metabissulfito de sódio (5mg de metabissulfito/100mL), na proporção de 1:4 p/v.

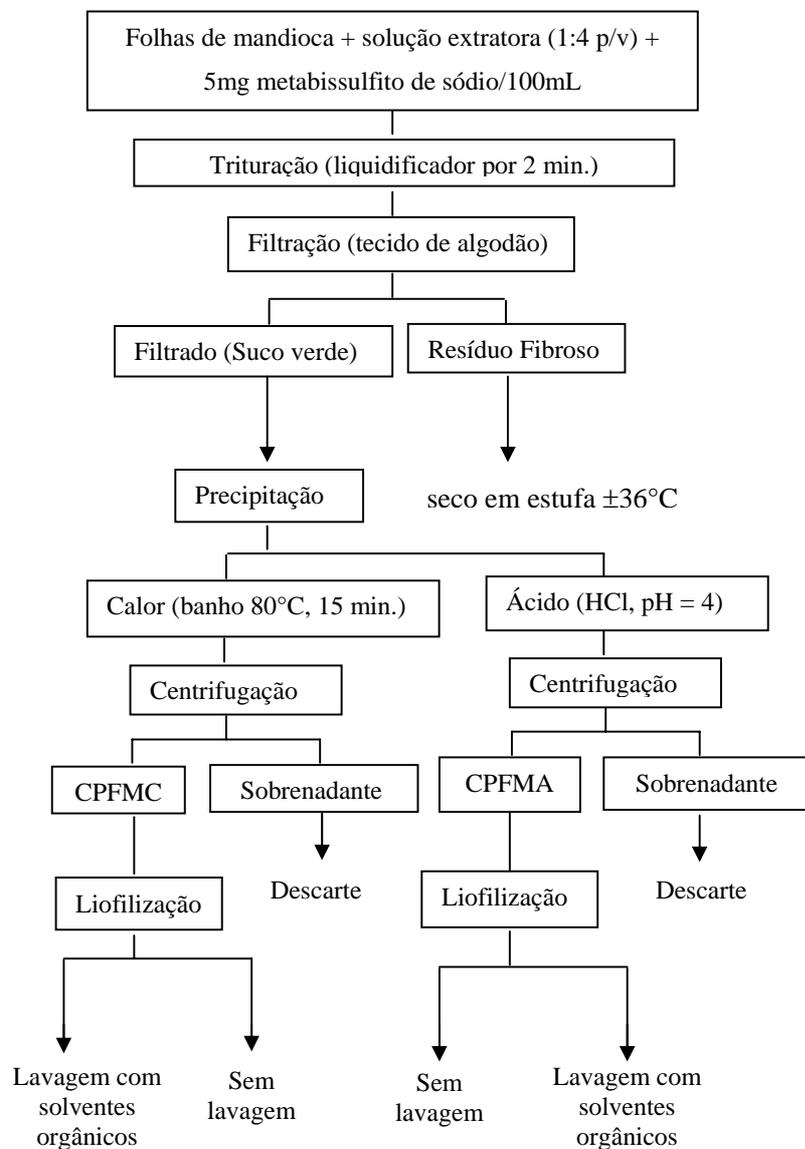


FIGURA 3 Fluxograma de obtenção do concentrado protéico de folhas de mandioca. CPFMC: concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor; CPFMA: concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido;

Esses CPFM foram secos em estufa ventilada a $\pm 36^{\circ}\text{C}$, diferentemente do que foi realizado após a escolha da solução extratora, cuja desidratação foi feita por liofilização.

3.4 Lavagem dos concentrados protéicos de folhas de mandioca

Os CPFM foram lavados com vários solventes orgânicos, com a finalidade de reduzir os níveis dos possíveis antinutrientes, melhorando a digestibilidade protéica.

3.4.1 Com etanol e etanol 50%

O CPFMC e o CPFMA foram lavados com etanol e com etanol 50%, na proporção de 1:25 (p/v), em agitação, à temperatura ambiente por 30 minutos, com uma reextração nas mesmas condições. Após, filtrou-se e os resíduos foram colocados para evaporar em temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, foram triturados em gral e armazenados em frascos hermeticamente fechados. Esses concentrados foram denominados de concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor e lavado com etanol (CPFMC-OH) e concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido e lavado com etanol (CPFMA-OH); concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado pelo calor e lavado com etanol 50% (CPFMC-OH50%) e concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido e lavado com etanol 50% (CPFMA-OH50%).

3.4.2 Com éter etílico

Para a lavagem dos CPFMC e CPFMA com éter etílico empregou-se o aparelho de Soxhlet por 4h a $\pm 40^{\circ}\text{C}$. Em seguida, os resíduos foram colocados

para evaporar em temperatura ambiente por 24 horas e, depois, triturados em gral e armazenados em frascos hermeticamente fechados. Esses concentrados foram rotulados de concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor e lavado com éter (CPFMCéter) e concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido e lavado com éter (CPFMAéter).

3.4.3 Com acetona, mistura de acetona e hexano e hexano

O CPFMC foi lavado com acetona, com uma mistura de acetona e hexano (1:1,5) e outra com hexano, seguindo-se os mesmos passos descritos no subitem 3.4.1. Esses concentrados foram designados de concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor e lavado com acetona (CPFMCac), concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor e lavado com acetona/hexano (CPFMCac/hex) e concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor e lavado com hexano (CPFMC_{hex}).

3.4.4 Com etanol 50% a quente

Em um erlenmeyer adicionou-se o CPFMC e a solução aquosa de etanol 50% na proporção de 1: 25 (p/v). Levou-se o erlenmeyer tampado com papel alumínio ao agitador magnético a 50°C por 10 minutos. Após, seguiu-se os mesmos passos descritos no subitem 3.4.1. Esse concentrado foi denominado de concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor e lavado com etanol 50% a quente (CPFMC-OH50% quente 1x).

Repetiu-se a lavagem citada no parágrafo anterior, porém acrescentando-se uma reextração nas mesmas condições. Reuniu-se os extratos e seguiu-se os passos já citados. Esse concentrado foi denominado de concentrado protéico de

folhas de mandioca precipitado com calor e lavado duas vezes com etanol 50% a quente (CPFMC-OH50% quente 2x).

3.5 Análises

3.5.1 Composição centesimal

A composição centesimal foi realizada na FFM, nos CPFM e nos RF.

a) Umidade

A umidade das amostras, inclusive das folhas frescas, foi determinada por aquecimento em estufa, em temperatura entre 100°C e 105°C, até peso constante (AOAC, 1995).

b) Proteína bruta

A proteína bruta foi determinada com base no conteúdo de nitrogênio total, dosado pelo método Kjeldahl, que consiste em aquecer a substância nitrogenada em ácido sulfúrico concentrado, em presença de catalisador, de maneira que o nitrogênio e o hidrogênio presentes sejam convertidos em sal amoniacal. O nitrogênio é deslocado sob a forma de amônia, na etapa de destilação. O destilado é então titulado e é conhecido o teor de nitrogênio da amostra analisada. O fator 6,25 foi utilizado para a obtenção do teor de proteína bruta (AOAC, 1995).

c) Extrato etéreo

O processo foi baseado na extração de substâncias solúveis em éter etílico, utilizando-se o extrator contínuo tipo Soxhlet. Após a evaporação do

solvente, o teor de extrato etéreo foi determinado por diferença de peso (AOAC, 1995).

d) Cinzas

A determinação de cinzas foi realizada por incineração da amostra em forno tipo mufla, a 550°C, determinando-se a quantidade de resíduo resultante (AOAC, 1995).

e) Fibra detergente neutro

Após a digestão das amostras com solução para fibra detergente neutro (FDN), o extrato foi filtrado e o resíduo lavado com água e acetona. Em seguida foi levado à estufa por 24 horas e a quantidade de fibras foi determinada por diferença de peso (Van Soest & Wine, descrito por Silva, 1990).

f) Extrato não nitrogenado

O extrato não nitrogenado foi calculado por diferença das determinações anteriores em porcentagem $[100 - (\text{umidade} + \text{proteína bruta} + \text{extrato etéreo} + \text{cinzas} + \text{FDN})]$.

3.5.2 Composição mineral

Os teores dos seguintes minerais: P, K, Ca, Mg, S, Cu, Mn, Zn e Fe foram determinados na FFM, nos CPFM e nos RF. As amostras foram colocadas em blocos digestores com controle de temperatura para realização de uma digestão nitroperclórica. O P e o S foram determinados por colorimetria, o K por fotometria de chama e Ca, Mg, Cu, Mn, Zn e Fe por espectrofotometria de absorção atômica (Malavolta et al., 1997).

3.5.3 Polifenóis

As amostras foram submetidas à extração com metanol 50%, em refluxo por três vezes consecutivas, a 80°C. Os extratos foram reunidos e submetidos à dosagem de polifenóis segundo Folin-Denis, usando ácido tânico como padrão (Goldstein & Swain, 1963).

3.5.4 Inibidor de tripsina

As amostras foram extraídas com solução NaOH 0,01N em agitação sob temperatura ambiente. Para o ensaio, usou-se como substrato o BAPNA (benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) e a enzima tripsina; a leitura foi feita a 410nm em espectrofotômetro. A atividade do inibidor de tripsina foi expressa em termos de unidades de tripsina inibida (UTI) (Kakade et al., 1969, 1974).

3.5.5 Saponina

Empregou-se etanol para extração de saponina das amostras, em agitação por 1 hora, à temperatura ambiente. O teor de saponina foi determinado pela reação da saponina com o anisaldeído e a digitonina utilizada como padrão (Baccou et al., 1977).

3.5.6 Hemaglutinina

As amostras sofreram uma extração com uma solução salina (NaCl) 0,85 g/100g tamponada em pH 7,4 em agitação à temperatura ambiente por um período de três horas. Foi utilizada uma placa de microtitulação, à qual adicionou-se o extrato, fizeram-se algumas diluições e, logo depois, adicionou-se a suspensão de eritrócitos a 2% (foi utilizado, para essa análise, sangue

humano tipo A Rh+ e Rh- e sangue bovino). A hemaglutinação foi observada através de uma leitura visual, após um período de uma hora (Calderón de la Barca et al., 1985).

3.5.7 Cianeto

Os glicosídeos cianogênicos foram extraídos das amostras, inclusive das folhas frescas, em solução ácida. Esses extratos foram submetidos à ação da linamarase obtida das folhas de mandioca. O cianeto liberado foi quantificado empregando-se cianeto de potássio como padrão (Corrêa et al., 2002).

3.5.8 Digestibilidade protéica *in vitro*

Pesou-se uma amostra com teor de nitrogênio conhecido e, em seguida, realizou-se uma digestão com pepsina e pancreatina em seus pH ótimos. Após, interrompeu-se a reação por meio da adição de ácido tricloroacético, precipitando-se as proteínas não digeridas. Em seguida, centrifugou-se e o nitrogênio foi dosado no sobrenadante (Akeson & Stahmann, 1964).

3.5.9 Propriedades funcionais

a) Absorção de água e óleo

A amostra foi suspensa em água ou óleo, misturada em alta velocidade e, em seguida, centrifugada. O volume do sobrenadante foi medido e a quantidade de água ou óleo absorvidos foi multiplicada por suas respectivas densidades para a conversão em gramas (Okezie & Bello, 1988).

b) Solubilidade de nitrogênio

A amostra foi misturada com água destilada, ajustando-se o pH em 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, com solução de NaOH ou HCl. Foi então centrifugada e o sobrenadante foi analisado segundo o método Kjeldahl (Beuchat, 1977).

c) Volume de espuma

A amostra foi suspensa em água destilada e agitada por 3,5 minutos; a mistura foi transferida para uma proveta, na qual foram determinados os volumes de espuma em diferentes tempos (0, 30, 60 e 120 minutos). O volume de espuma, expresso em porcentagem, foi calculado considerando-se 100% o volume de espuma no tempo zero (Wang et al., 1992).

d) Estabilidade de emulsão

A amostra foi dispersa em água destilada e o óleo foi adicionado aos poucos sob agitação por 30 segundos; depois, homogeneizou-se em alta velocidade por mais 60 segundos. A mudança volumétrica de espuma, de óleo e de fase aquosa foi observada após 30 minutos, 2 horas e 6 horas (Okezie & Bello, 1988).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção do concentrado protéico de folhas de mandioca

Para que ocorressem a desintegração celular e a liberação das proteínas contidas nos diferentes compartimentos celulares das folhas de mandioca, foi utilizado um liquidificador. Nesse processo é importante a exposição a um agente extrator e, para isso, foram realizados testes com diferentes soluções extratoras: solução de NaOH 0,05N, solução de NaOH 0,01N e água destilada, todas contendo metabissulfito de sódio.

A solução de NaOH foi usada, pois, sabe-se, que a elevação do pH aumenta a extração das proteínas. O metabissulfito de sódio foi adicionado para inibir ou diminuir as reações de oxidação de fenóis com as proteínas (Hernández et al., 1998; Molina, 1989; Natividade, 1992).

O pH e a temperatura do suco verde foram de 9,8 e 32°C; de 7,6 e 30°C e de 5,7 e 29°C, quando utilizadas a solução extratora de NaOH 0,05N; NaOH 0,01N e água destilada, respectivamente. A precipitação com calor foi dificultada em meio alcalino, necessitando de um abaixamento prévio do pH do suco a 6,0, antes de submeter à coagulação com calor. Os CPFM produzidos com as três soluções extratoras apresentaram uma coloração muito escura, todavia esse escurecimento foi devido à secagem em estufa.

O rendimento de extração protéica das diferentes soluções extratoras testadas, NaOH 0,05N, NaOH 0,01N e água destilada, foi de: $60,30 \pm 0,01\%$, $56,60 \pm 4,70\%$, e $54,93 \pm 3,57\%$, em média, respectivamente, considerando as duas formas de precipitação. Portanto, a solução de NaOH 0,05N foi a que apresentou maior rendimento. Todavia, o elevado valor do pH (9,8) do suco verde pode acarretar prejuízos à qualidade da proteína, indisponibilizando o aminoácido lisina, e a necessidade de abaixar o pH a 6,0 para a precipitação com calor levou

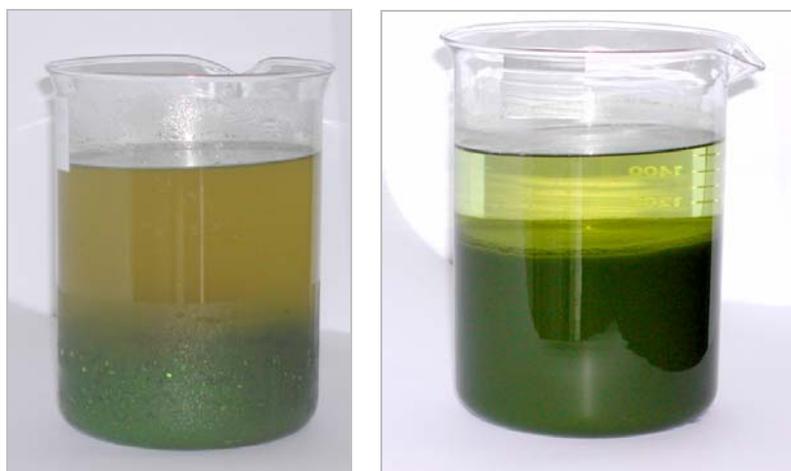
à escolha da água destilada como solução extratora, pois, praticamente não houve diferença no rendimento protéico em relação à solução de NaOH 0,01N. Além disso, a água é de mais baixo custo e o processo de obtenção do concentrado protéico de folhas de mandioca (CPFM) exige um tempo relativamente grande de preparação e mais uma etapa poderia prejudicar a qualidade nutritiva do mesmo.

Molina (1989), estudando CPFM, utilizou solução de NaOH para a extração das proteínas, obtendo um pH do suco igual a 9, e para a precipitação, teve de reduzir o pH até 4. Em termos de resultado, este autor obteve baixos rendimentos, além de acarretar mais uma etapa no processo de obtenção do CPFM.

Medeiros et al. (1999), em seu trabalho com CPF de aguapé, testaram a precipitação da proteína em vários pH e o mais eficaz foi observado em pH baixo. Também verificaram que a solução de NaOH 0,05N foi mais eficiente que a água para promover a extração das proteínas, contudo, tiveram de reduzir o pH do suco até 3,5, antes da precipitação com calor a 80°C.

A temperatura de 80°C para precipitação, usada neste trabalho, forneceu um coágulo bem formado (Figura 4a), o que facilitou a sua separação do sobrenadante. O método de precipitação com calor é o mais utilizado para se obter CPF, segundo dados da literatura (Aletor et al., 2002; Fasakin, 1999; Fasuyi, 2005; Fasuyi & Aletor, 2005; Szymczyk, 1995).

As proteínas do suco verde precipitadas com HCl em pH 4 geraram um coágulo com uma textura bem definida e também de fácil separação (Figura 4 b). Na literatura há relatos do emprego desse valor de pH em alguns trabalhos com CPF (Molina, 1989; Ohshima, & Ueda, 1984; Ohshima, 1985).



(a)

(b)

FIGURA 4 a) Precipitação com calor e b) precipitação com ácido

Como a secagem dos CPF em estufa ocasionou escurecimento, optou-se pela liofilização, por não provocar escurecimento ou alteração do valor nutritivo e das propriedades funcionais das proteínas dos concentrados, apesar de seu custo elevado.

O CPFM é um pó verde. Devido a essa coloração, ele pode ser rejeitado pelos consumidores, apesar do seu valor nutritivo. O CPFM precipitado com calor (CPFMC) apresentou uma coloração verde mais clara, quando comparado ao concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido (CPFMA) (Figura 5a e j).

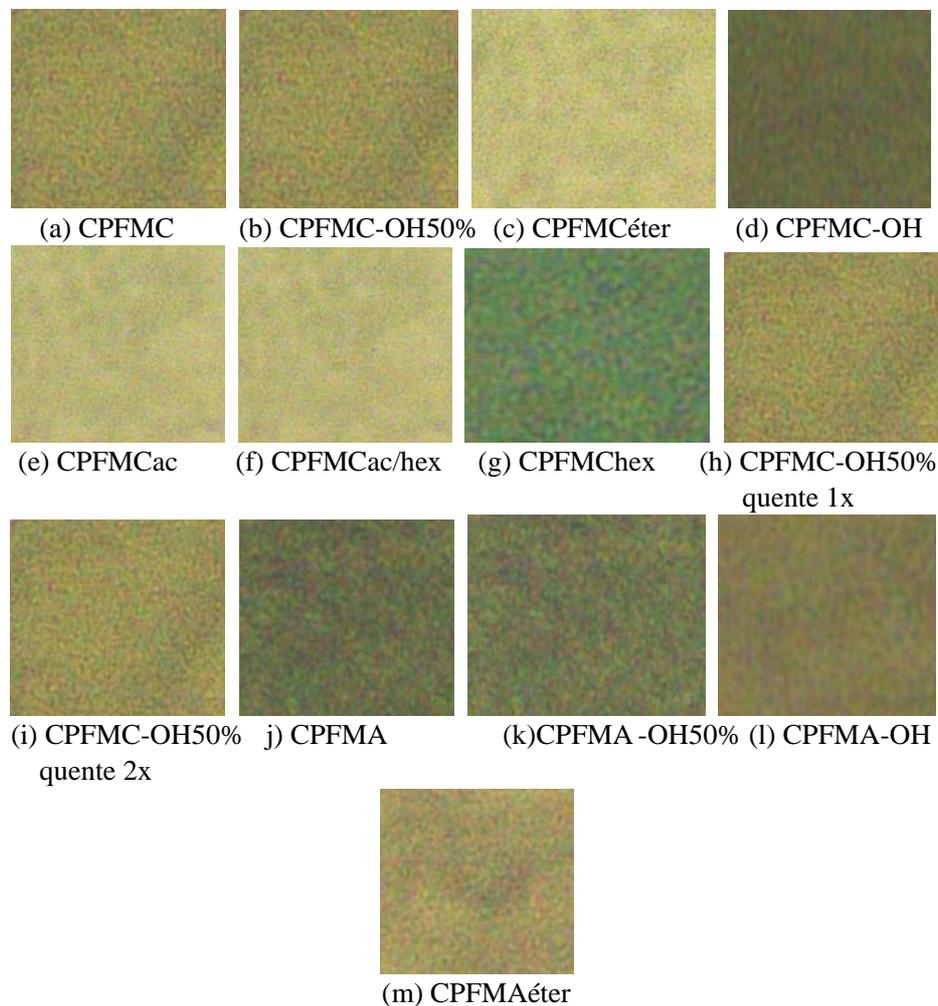


FIGURA 5 Coloração dos concentrados protéicos de folhas de mandioca (CPFMC) precipitados com calor (CPFMC) (a) e com ácido (CPFMA) (j) e lavados com vários solventes.

b) CPFMC-OH50%: CPFMC lavado com etanol 50%; c) CPFMCéter: CPFMC lavado com éter; d) CPFMC-OH: CPFMC lavado com etanol; e) CPFMCac: CPFMC lavado com acetona; f) CPFMCac/hex: CPFMC lavado com mistura de acetona e hexano; g) CPFMChex: CPFMC lavado com hexano; h) CPFMC-OH50% quente1x: CPFMC lavado com etanol 50% à quente; i) CPFMC-OH50% quente 2x: CPFMC lavado duas vezes com etanol 50% à quente; k) CPFMA-OH50%: CPFMA lavado com etanol 50%; l) CPFMA-OH: CPFMA lavado com etanol; m) CPFMAéter: CPFMA lavado com éter.

4.2 Composição centesimal da farinha de folhas de mandioca, dos concentrados protéicos de folhas e dos resíduos fibrosos

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das composições centesimais da farinha de folhas de mandioca (FFM), dos concentrados protéicos de folhas (CPFM) e dos resíduos fibrosos (RF). Os dois métodos de precipitação utilizados para a obtenção do CPFM praticamente não acarretaram diferenças nesses resultados.

TABELA 2 Composição centesimal (g/100 g MS)¹ da FFM, dos CPF e dos RF.

Amostras ²	Proteína bruta	Extrato etéreo	Cinzas	FDN ³	ENN ⁴
FFM	34,37±1,78	12,52±1,35	6,52± 0,31	21,40±0,93	25,19±2,36
CPFMC	54,03±2,50	17,50±1,05	2,19±0,12	ND ⁵	26,28±2,81
CPFMA	54,39±1,74	17,28±0,30	2,17±0,23	1,64±0,63	24,52±1,96
RFC	19,77±0,40	6,97±0,25	5,70±0,28	47,94±0,88	19,62±0,62
RFA	19,07±0,36	6,68±0,28	5,59±0,05	41,15±1,11	27,51±0,87

Umidade das folhas de mandioca, da FFM, do RFC e do RFA: 74,57±0,69 g/100g; 9,46±0,56 g/100g, 10,64±0,45 g/100g e 10,65±0,28 g/100g, respectivamente.

¹MS: Matéria seca; média de 3 repetições ± desvio padrão.

² FFM: farinha de folhas de mandioca; CPFMC: concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor; CPFMA: concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido; RFC: resíduo fibroso da precipitação com calor; RFA: resíduo fibroso da precipitação com ácido

³FDN: fibra detergente neutro

⁴ENN: extrato não nitrogenado

⁵ND: não detectado.

O teor de proteína da FFM (34,37 g/100g de matéria seca - MS) está dentro da faixa relatada pela literatura (23,25 a 36,64 g/100g MS) para folhas de diferentes cultivares de mandioca (Corrêa et al., 2004; Madruga & Câmara, 2000; Melo, 2005; Wobeto, 2003). A FFM estudada possui um teor mais elevado em proteínas que as folhas de taioba (27,59g/100g MS) (Pinto et al., 2001) e que as folhas de couve (30,85 g/100g MS) (Fonseca et al., 2002).

O nível de proteína do CPFM (54,21g/100g MS em média) aumentou 57,72% em comparação ao da FFM. O CPFM contém um teor protéico maior que o encontrado por alguns autores, que variaram de 25,10 a 45,68 g/100g MS (Salgado & Santos, 1986; Molina 1989; Heinemann, 1998; Tangka, 2003), sendo mais ricos que os CPF de taioba (28,3 a 51,8 g/100g MS) preparados através de diferentes métodos de precipitação (Espíndola, 1987). Carlsson et al. (1984) utilizando folhas de napier para a produção de CPF, empregaram diferentes métodos de precipitação: com calor (75°C, em pH 6), com ácido (pH 4, com HCl) e com etanol (30°C, em pH 6) encontraram porcentagens de proteína semelhantes. As diferenças na porcentagem de proteína extraída podem ser devido à espécie e ao processo mecânico empregado.

Os RF contêm uma fração considerável de proteína (19,42g/100g MS), sendo superior ao encontrado por Chaves (1987) para o RF de folhas de mandioca, 14,30g/100g MS e comparado aos RF de taioba, 17,60 a 22,5 g/100g MS, de amaranto, 16,80 a 23,20 g/100g MS, sendo superior ao RF de folhas de batata-doce, 15,30 g/100g MS (Espíndola, 1987), constituindo assim uma boa fonte de alimentação alternativa para os ruminantes.

O teor de extrato etéreo da FFM (12,52 g/100g MS) se encontra dentro da variação observada pela literatura, de 3,30 a 16,00 g/100g MS (Aletor & Adeogun, 1995; Madruga & Câmara, 2000; Melo, 2005; Molina, 1989; Ortega-Flores et al., 2003; Ravindran & Ravindran, 1988). Essas diferenças,

provavelmente, devem-se a cultivar, idade da planta, maturidade das folhas, entre outros.

Pode-se perceber um aumento do teor de extrato etéreo dos CPFM (17,39 g/100g MS) em comparação com o da FFM. Uma possível explicação para isso seria o fato de que, durante a coagulação das proteínas, os lipídeos, possivelmente são co-precipitados, concentrando-se no CPF grande parte dos lipídeos totais. O teor de extrato etéreo do CPFM deste trabalho também se encontra acima do observado por Heinemann et al. (1998), 12,26 g/100g MS e por Molina (1989), 12,15 a 15,89 g/100g MS para o CPFM.

Alguns autores encontraram uma variação de 4,62 a 8,30 g/100g MS para o teor de cinzas da FFM (Aletor & Adeogun, 1995; Melo, 2005; Molina, 1989; Ortega-Flores et al., 2003; Wobeto, 2003), permitindo constatar que o teor de cinzas da FFM em estudo (6,52 g/100g MS) está dentro da faixa relatada pela literatura. O teor de cinzas do CPFM foi reduzido para 2,18 g/100g MS e dos RF para 5,65 g/100g MS, em média, em comparação com o da FFM. O teor de cinzas dos CPFM encontrado é inferior aos dados da literatura, 5,68 a 8,74 g/100g MS (Heinemann et al., 1998; Molina, 1989).

Diversos autores encontraram teores de FDN para FFM variando de 28,90 a 35,40 g/100 g MS (Corrêa et al., 2004; Melo, 2005; Reed et al., 1982), que são diferentes dos encontrados neste trabalho (21,40 g/100 g MS). Constatou-se que, ao se produzir os CPFM, a quantidade de fibras reduziu acentuadamente (para o CPFMA foi encontrado 1,64 g/100g MS e para o CPFMC não foi detectada sua presença). Já o teor de FDN dos RF, como era esperado, foi bem elevado (47,94 g/100g MS para o RFC e 41,15 g/100g MS para o RFA).

Os rendimentos de extração das proteínas de folhas de mandioca estão registrados na Tabela 3. Os dois métodos de precipitação utilizados para a obtenção dos CPFM praticamente não mostraram diferenças nesses resultados.

O rendimento em matéria seca foi de 32,28%, em média e está bem próximo do encontrado por Chaves (1987), que também estudou a influência das condições de precipitação no rendimento de extração das proteínas de folhas de mandioca. Ele utilizou uma máquina de moer carne para a extração das proteínas com solução de NaOH 0,05N, encontrando 30,40% de rendimento em matéria seca para a precipitação com calor a 85°C. Já Molina (1989) utilizou um liquidificador para a extração das proteínas com solução de NaOH e observou um rendimento inferior ao desse trabalho, 11,30%, no CPFM obtido a pH 3,5 seguido do aquecimento a 85°C.

TABELA 3 Rendimento de extração das proteínas de folhas de mandioca

Amostras	Peso seco (g)	Rendimento	
		Peso (%)	Proteína (%)
Folhas frescas ¹	101,72±0,00	-	-
CPFMC ²	32,00±1,24	31,35±1,25	54,58±1,87
CPFMA ³	33,74 ±1,10	33,21±1,10	58,00±2,91

Média de 3 repetições ± desvio padrão.

¹ 400g de folhas frescas com teor de umidade de 74,57 g/100g ± 0,69.

² CPFMC: concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor.

³ CPFMA: concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido.

O rendimento em peso deste trabalho está acima da variação encontrada para outros tipos de folhas. Espíndola (1987), utilizando um picador de carne e um desintegrador de cana e bagaço para a extração mecânica e diferentes soluções extratoras e formas de precipitações, encontrou uma faixa de

rendimento de extração em peso de 10,2% a 28,8% para hortaliças e de 9,8% a 24,6% para leguminosas.

O rendimento de extração das proteínas foi de 54,58% para o CPFMC e de 58,00% para o CPFMA. Rendimento próximo foi observado por Chaves (1987), 51,80%, para a precipitação com calor a 85°C. Um resultado bem inferior ao deste trabalho foi encontrado por Molina (1989), 20,84% para CPFM obtido por termocoagulação ácida (pH 4 seguido de aquecimento a 85°C) e 14,97% para o CPFM obtido por precipitação isoelétrica (pH 4).

O liquidificador utilizado nesse estudo foi tão eficiente quanto a máquina de moer carne usada por Chaves (1987) para a extração das proteínas. Já Espíndola (1987), que utilizou um picador de carne para a trituração de folhas de leguminosas, observou um acúmulo de fibras no disco de saída, gerando atrito e, assim provocando um aquecimento durante o processo gerando baixos rendimentos de extração das proteínas (15,60% a 19,30%).

Urribarrí et al. (2004), estudando as condições de extração das proteínas de folhas de capim-elefante, observaram máximo rendimento de extração em temperaturas entre 30°C e 60°C, e entre 60°C e 90°C este rendimento diminuiu. Provavelmente, temperaturas elevadas causaram uma desnaturação das proteínas ocasionando perda da sua solubilidade devido à exposição de seus grupos hidrofóbicos ao meio.

4.3 Composição mineral

Na Tabela 4 encontram-se os resultados das análises dos seguintes minerais: P, K, Ca, Mg, S, Cu, Mn, Zn e Fe da FFM, dos CPFM e dos RF. O teor de P da FFM (0,29 g/100g MS) está dentro da faixa relatada pela literatura de 0,19 a 0,45 g/100g MS (Madruga & Câmara, 2000; Wobeto, 2003; Melo, 2005). O maior teor desse mineral foi observado no CPFMA (0,32 g/100g MS);

já no CPFMC (0,22 g/100g MS) houve uma pequena redução quando se comparou com a FFM. Os menores teores desse mineral foram encontrados nos RF.

Wobeto (2003) e Melo (2005) encontraram, para FFM, teores de K variando de 1,12 a 1,63 g/100g MS, faixa na qual se encontra a FFM em estudo (1,59 g/100g MS). Ocorreu uma grande redução no teor desse mineral quando se produziu os CPFM e o mesmo ocorreu com o CPF de napier (Espíndola, 1987) e com o de cana-de-açúcar (Natividade, 1992). Isso mostra que o K ficou solúvel no sobrenadante que foi descartado, podendo, assim, contribuir como fertilizante.

O nível de Ca observado na FFM (1,09 g/100g MS) coincide com a faixa mencionada pela literatura, de 0,67 a 1,43 g/100g MS (Madruga & Câmara, 2000; Melo, 2005; Wobeto, 2003). Os CPFM apresentaram baixo conteúdo desse mineral (0,38 g/100g MS em média) em relação aos CPF de folhas de guandu (1,09 g/100g MS) e de folhas de taioba (3,71 g/100g MS) (Espíndola, 1987). Concordando com este trabalho, alguns autores observaram que, ao produzir o CPF, esse nível tende a abaixar (Espíndola, 1987; Natividade, 1992). Houve uma intensificação desse mineral nos RF, apresentando um teor mais elevado em Ca (1,62 g/100g MS) que o RF de cana-de-açúcar, 0,31 g/100g MS (Natividade, 1992).

De acordo com a literatura científica, são descritas variações, para o Mg, de 0,16 a 0,35 g/100g MS (Madruga & Câmara, 2000; Wobeto, 2003; Melo, 2005) e, para o S, de 0,23 a 0,41 mg/100g MS (Melo, 2005; Chavez et al., 2000; Wobeto, 2003). O teor, tanto de Mg (0,32 g/100g MS) quanto de S (0,29 g/100g MS), da FFM em estudo está incluído nessa variação.

TABELA 4 Teores de minerais da FFM, dos CPFM e dos RF.

Amostras ¹	(g/100gMS)					(mg/kgMS)			
	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Mn	Zn	Fe
FFM	0,29±0,01	1,59±0,03	1,09±0,06	0,32±0,03	0,29±0,01	10,71±0,25	188,0±1,27	93,38±1,33	98,40±2,60
CPFMC	0,22±0,01	0,15±0,00	0,38±0,04	0,07±0,01	0,56±0,04	9,80±0,50	60,17±3,31	91,00±0,28	188,45±1,76
CPFMA	0,32±0,02	0,13±0,03	0,37±0,01	0,04±0,00	0,58±0,05	16,10±0,75	27,70±2,44	40,20±1,23	154,40±0,28
RFC	0,13±0,00	0,49±0,03	1,64±0,06	0,36±0,01	0,13±0,00	4,22±0,32	444,27±2,61	97,97±1,82	47,93±1,63
RFA	0,13±0,00	0,47±0,01	1,60±0,04	0,36±0,00	0,13±0,00	5,32±0,08	397,20±4,18	109,98±4,08	49,61±2,56

Média de 3 repetições ± desvio padrão.

¹FFM: farinha de folhas de mandioca; CPFMC: concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor; CPFMA: concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido; RFC: resíduo fibroso da precipitação com calor; RFA: resíduo fibroso da precipitação com ácido.

Os CPFM apresentaram quantidades muito reduzidas de Mg, já os RF tiveram o teor mais elevado desse mineral (0,36 g/100g MS). O CPFMC e o CPFMA apresentaram teores mais elevados de S que a FFM e os RF, provavelmente porque esse mineral faz parte da estrutura dos aminoácidos sulfurados.

O teor de Cu da FFM (10,71 mg/kg MS) está dentro da faixa referida pela literatura: 4,05 a 29,10mg/kg MS (Chavez et al., 2000; Wobeto, 2003). Praticamente, não houve diferença entre o teor de Cu da FFM e do CPFMC, porém, o CPFMA apresentou um teor bem mais elevado (16,10 mg/kg MS).

A literatura relata uma variação de 50,3 a 333,69 mg/kg MS de Mn (Chavez et al., 2000; Wobeto, 2003; Melo, 2005), faixa esta em que se encontra a FFM (188 mg/kg MS). Os teores desse mineral da FFM e do CPFMC são maiores que os da soja (41,00 mg/kg) e do agrião (40,00 mg/kg) (Franco, 2000). Os RF se apresentaram com altos teores de Mn (420,74 mg/kg MS, em média), com níveis mais elevados que os RF de taioba, 360,00 mg/kg MS, (Espíndola, 1987) e de cana-de-açúcar, 17,74 mg/kg MS, (Natividade, 1992). Em altas concentrações esse mineral sob a forma de cloreto e sulfato interfere a absorção de ferro. É essencial para o metabolismo do colesterol, o crescimento corpóreo e a reprodução (Franco, 2000).

O teor de Zn da FFM (93,38 mg/kg MS) apresentou-se mais elevado quando comparado ao de Chavez et al. (2000) e de Wobeto (2003) (35,8 mg/kg a 67,10mg/kg MS). O teor desse mineral encontrado para o CPFMC foi bem superior em relação ao CPFMA. Comparando-se o teor de Zn encontrado na carne de boi (17,00 mg/kg) com os deste trabalho, pode-se considerar que os CPFM são excelentes fontes desse mineral. Vale ressaltar que o Zn de fontes vegetais é menos aproveitado pelo organismo (Franco, 2000).

Foram observados 98,40 mg/kg de MS de Fe na FFM, o que está de acordo com a variação relatada pela literatura, de 61,5 a 119 mg/kg (Melo, 2005; Chavez et al., 2000; Madruga & Câmara, 2000). No Nordeste brasileiro, o uso

de pequenas quantidades de FFM, como uma colher de chá ao dia, tem se mostrado muito eficiente para suprir a falta de ferro, em casos de anemia. A deficiência desse mineral uma das causas mais comuns de anemia nutricional no homem (Motta et al., 1994; Franco, 2000).

O CPFMC teve um aumento de 91,51% e o CPFMA de 56,91%, no teor de Fe quando comparado com o da FFM. Esse aumento mostra que os CPFM podem suprir ainda mais uma deficiência desse mineral no organismo. Segundo RDA (1989), a recomendação nutricional é de 10 mg/dia de Fe para crianças. O teor médio de Fe dos CPFM (171,43 mg/kg MS, em média) foi superior aos encontrados em folhas de cenoura (57,10 mg/kg MS) e em brócolis (150 mg/kg) (Franco, 2000; Pereira et al., 2003). Quando comparam-se os teores de Fe da FFM e os dos CPFM com fontes convencionais, como, por exemplo, a gema de ovo (58,70 mg/kg) observa-se que eles são ricos em Fe (Franco, 2000). Todavia, deve-se observar que o ferro da gema é 100% aproveitado pelo organismo, enquanto que nos alimentos de origem vegetal, o aproveitamento é de 15% a 30% (Franco, 2000). Os RF também se mostraram com elevados teores de Fe, todavia grandes quantidades de fibras podem reduzir a absorção desse mineral (Franco, 2000). O Fe é essencial para a formação da hemoglobina, uma proteína especializada no transporte de oxigênio na corrente sanguínea já sua deficiência pode provocar cáries, fadiga e cefaléia, entre outros (Franco, 2000; Vieira et al., 2002).

4.4 Lavagem dos concentrados protéicos de folhas de mandioca com vários solventes

Os dados da Tabela 5 representam os teores de proteína bruta e de digestibilidade protéica *in vitro* da FFM, dos CPFM não lavados e dos lavados com vários solventes. A digestibilidade do CPFM aumentou 93,55%, em

comparação com a FFM. Esse aumento ocorreu devido à remoção das fibras e também à redução dos polifenóis (Tabela 6, página 51).

Nas duas formas de precipitação utilizadas para a obtenção dos CPFM praticamente não foram verificadas diferenças na digestibilidade. A digestibilidade do CPFM não lavado foi, em média, de 54,93%. Salgado & Santos (1986) determinaram a digestibilidade protéica de uma dieta de CPFM precipitado com calor (entre 60°C e 65°C) contendo 10% em proteína administrada a ratos e encontraram 48,50%. Já Molina (1989) encontrou uma digestibilidade protéica *in vitro* de 80,00% para o CPFM precipitado com ácido (pH 4 seguido de aquecimento a 85°C). Essas diferenças devem ser devido, provavelmente, ao processamento empregado na obtenção do CPFM, além da cultivar, da idade e da maturidade das folhas.

Em relação à lavagem dos CPFM, inicialmente foram lavados com uma solução de etanol 50%. A escolha desse solvente foi baseada no trabalho de Corrêa et al. (2004), no qual observaram que a solução de etanol 50% foi eficiente na remoção de antinutrientes com conseqüente aumento da digestibilidade da FFM e também porque são poucos os seus efeitos tóxicos, além de não ser um processo caro e poder ser recuperado com um custo razoavelmente baixo (Carlsson et al., 1982). Entretanto, o teor de proteína bruta e a digestibilidade do CPFMC e do CPFMA lavados com etanol 50% (CPFMC-OH50% e CPFMA-OH50%) foram inferiores aos não lavados (Tabela 5). Em relação à coloração, essa lavagem não provocou alteração na cor dos CPFM (Figura 5, página 39).

TABELA 5 Teores de proteína bruta e de digestibilidade protéica *in vitro* da FFM^a, dos CPFM^b não lavados e dos lavados com vários solventes.

Amostras	Proteína bruta (g/100g)	Digestibilidade protéica <i>in vitro</i> ^p (%)
FFM	34,37±1,78	28,38±3,09
CPFm antes da lavagem com solvente		
CPFMC ^c	54,02±2,49	55,82±1,89
CPFMA ^d	54,40±1,74	54,03±2,51
CPFm após a lavagem com solvente		
CPFMC-OH50% ^e	52,17±0,29	50,69±0,34
CPFMA-OH50% ^f	51,88±1,08	50,65±1,00
CPFMCéter ^g	58,64±0,03	56,19±2,36
CPFMAéter ^h	57,83±0,88	54,33±0,33
CPFMC-OH ⁱ	63,62±0,00	57,21±0,43
CPFMA-OH ^j	59,65±0,00	56,25±0,17
CPFMCac ^k	65,00±0,00	59,46±0,55
CPFMCac/hex ^l	62,03±0,00	59,07±2,36
CPFMC ^m hex	56,48±0,00	54,52±2,36
CPFMC-OH50% quente1x ⁿ	54,81±0,00	48,66±0,00
CPFMC-OH50% quente 2x ^o	58,43±0,00	48,39±0,00

Média de 3 repetições ± desvio padrão.

^aFFM: farinha de folhas de mandioca; ^bCPFm: concentrado protéico de folhas de mandioca; ^cCPFMC: CPFm precipitado com calor; ^dCPFMA: CPFm precipitado com ácido; ^eCPFMC-OH50%: CPFMC lavado com etanol 50%; ^fCPFMA-OH50%: CPFMA lavado com etanol 50%; ^gCPFMCéter: CPFMC lavado com éter; ^hCPFMAéter: CPFMA lavado com éter; ⁱCPFMC-OH: CPFMC lavado com etanol; ^jCPFMA-OH: CPFMA lavado com etanol; ^kCPFMCac: CPFMC lavado com acetona; ^lCPFMCac/hex: CPFMC lavado com mistura de acetona e hexano; ^mCPFMC^mhex: CPFMC lavado com hexano; ⁿCPFMC-OH50% quente1x: CPFMC lavado com etanol 50% a quente; ^oCPFMC-OH50% quente 2x: CPFMC lavado duas vezes com etanol 50% a quente;

^pValores corrigidos para caseína, considerada 100% digerível.

Um segundo solvente empregado na lavagem dos CPFM foi o éter etílico. A escolha deste se baseou no trabalho de Szymczyk (1995) que obteve aumento na digestibilidade da proteína, de até 47,19%, em todos os seus CPF de trevo vermelho após extração de lipídeos com éter. Ele concluiu que as frações solúveis nesse solvente presentes nos CPF tinham um efeito detrimental no valor nutritivo da proteína.

Embora a lavagem dos CPFM com éter tenha provocado um aumento médio de 7,42% em proteína, a digestibilidade praticamente não se alterou. A lavagem dos CPFM com éter ocasionou um tom verde bem mais claro ao serem comparados com os não lavados (Figura5).

Os teores de antinutrientes da FFM, dos CPFM e dos RF estão mostrados na Tabela 6. O nível médio de cianeto das folhas frescas de mandioca foi de 118,74 mg/100g MS, portanto, houve uma redução de 72,44% ao se comparar com o da FFM (32,73 mg/100g MS). O teor de cianeto está de acordo com a faixa registrada por Wobeto (2003) em FFM para diferentes cultivares e idades da planta (12,38 a 35,02 mg/100g MS).

O nível médio de cianeto dos CPFM foi de 5,77mg/100g MS, independente do agente precipitante; portanto, seus níveis reduziram 82,37% quando comparados aos da FFM. Molina (1989) também observou uma grande redução de cianeto quando produziu o CPFM comparado com a folha.

A lavagem dos CPFM com etanol 50% provocou uma redução média do teor de cianeto de 68,98% e com éter de 44,37%, quando comparado com o teor médio dos não lavados. O nível de cianeto dos CPFM lavados com éter e com etanol 50% não é considerado tóxico ao organismo. Segundo Ikediobi et al. (1980), são necessários teores de 5 a 10mg HCN/100g para serem considerados tóxicos. Os RF apresentaram os níveis mais baixos de cianeto, 1,15 mg/100g MS em média.

TABELA 6 Teores de antinutrientes da FFM^a, dos CPFM^b lavados e não lavados e dos RF^c.

Amostras	Cianeto (mg/100g MS)	Saponina (g/100g MS)	Inibidor de tripsina (UTI ¹ /mg MS)	Polifenóis (mg/g MS)
FFM	32,73±1,04	2,98±0,05	18,12±0,84	46,39±2,00
CPFMC ^d	6,12±0,28	1,63±0,13	24,56± 0,78	24,06 ±1,98
CPFMA ^e	5,41±0,29	2,26±0,12	25,08±0,96	23,57±3,15
CPFMC-OH50% ^f	1,47±0,34	1,59±0,08	18,00±0,85	15,45±0,76
CPFMC-éter ^g	2,91±0,65	0,62±0,00	6,77±0,24	22,98±0,24
CPFMA-OH50% ^h	2,11±0,30	1,56±0,04	2,43±0,32	16,46±1,19
CPFMA-éter ⁱ	3,52±0,62	0,55±0,05	8,29±0,45	25,49±0,00
RF ^j	1,10±0,08	2,90±1,30	-	36,48± 0,83
RFA ^k	1,19±0,13	2,67±0,07	-	35,41±1,66

Média de 3 repetições ± desvio padrão.

^aFFM: farinha de folhas de mandioca; ^bCPFMC: concentrado protéico de folhas de mandioca; ^cRF: resíduo fibroso; ^dCPFMC: CPFMC precipitado com calor; ^eCPFMA: CPFMC precipitado com ácido; ^fCPFMC-OH50%: CPFMC lavado com etanol 50%; ^gCPFMCéter: CPFMC lavado com éter; ^hCPFMA-OH50%: CPFMA lavado com etanol 50%; ⁱCPFMA-éter: CPFMA lavado com éter; ^jRF: RF da precipitação com calor; ^kRFA: RF da precipitação com ácido.

¹UTI: Unidades de tripsina inibida.

Os teores de saponina no CPFMC decresceram em comparação com os da FFM, tendo o CPFMC reduzido em 45,30%. Já os RF apresentaram níveis de saponina próximos ao da FFM. Segundo Carlsson (1980), a lavagem com solventes orgânicos pode reduzir a quantidade de saponina em CPF, o que pôde ser constatado no presente trabalho, tendo uma eficiência de remoção maior com o éter etílico, havendo uma redução de até 75,66% (CPFMAéter).

Observa-se, na Tabela 6, que o nível de inibidor de tripsina aumentou na preparação do CPFMC. Devido à natureza protéica do inibidor de tripsina, é natural a acentuação desses nos CPF. Dantas-Barros (1984) também verificou aumento nos níveis de inibidor de tripsina na obtenção de diversos CPF de

leguminosas. Mesmo na precipitação com calor (80°C, por 15 minutos), essa temperatura não foi suficiente para inativar o inibidor, o que está de acordo com Genovese & Lajolo (2000), que afirmam que em isolados protéicos, a estabilidade térmica do inibidor de tripsina aumenta.

Em relação à lavagem dos CPFM com etanol 50%, na precipitação ácida ocorreu uma redução de 90,31% de inibidor de tripsina, enquanto que na precipitação com calor, houve uma redução de apenas 26,71% em comparação com os não lavados. Já na lavagem com éter não foi constatada uma diferença acentuada em termos de precipitação, sendo 66,95% de redução para ácida e 72,43% para o calor.

O teor de polifenóis da FFM deste trabalho foi de 46,39mg/g MS, estando dentro da faixa citada pela literatura, de 29,30 a 106,43mg/g MS (Corrêa et al., 2004; Melo, 2005; Padmaja, 1989; Wobeto, 2003). Observou-se que o teor de polifenóis dos CPFM reduziu 48,66% (em média), em comparação com o da FFM.

Quando se utilizou o etanol 50% para lavagem, houve uma redução de 35,78% e 30,17% para os teores de polifenóis dos CPFMC e CPFMA, respectivamente, quando comparados com os dos não lavados. Contudo, quando o solvente utilizado foi o éter etílico, houve uma redução no teor de polifenóis de 4,49% para o CPFMC e um aumento de 8,15% para o CPFMA.

Foi realizada a análise de hemaglutinina com sangue humano tipo A, Rh + e Rh - e em sangue bovino na FFM, nos CPFM e nos RF, não sendo observada atividade hemaglutinante nessas amostras. De cinco cultivares, aos 12 meses de idade da planta, Wobeto (2003) encontrou atividade hemaglutinante até a primeira diluição do extrato da FFM na base 2 (2¹) em duas delas. Já Melo (2005) a detectou até a segunda diluição do extrato na base 2 (2²) para a cultivar Cacao, também aos doze meses de idade da planta. Portanto, essas diferenças encontradas são inerentes à cultivar.

Verificou-se que o etanol 50% foi mais eficiente na remoção de inibidor de tripsina no CPFMA, de polifenóis e de cianeto nos CPFMC e CPFMA que o éter etílico.

Apesar da lavagem dos CPFM ter acarretado redução nos níveis de polifenóis e inibidor de tripsina, não foi constatada melhoria na digestibilidade protéica. Provavelmente, outros fatores podem ter contribuído, não permitindo melhorias na digestibilidade protéica, como, por exemplo, certas reações que podem ter ocorrido, prejudicando a digestão de proteína, a própria característica protéica ou, ainda, devido à presença de outras substâncias.

Como as lavagens com etanol 50% e éter não trouxeram melhorias na digestibilidade, decidiu-se empregar outros solventes orgânicos, cujos resultados estão na Tabela 5 (página 49).

A lavagem dos CPFM com etanol (CPFMC-OH e CPFMA-OH) acarretou um aumento médio de 13,70% no teor protéico e de 3,27% na digestibilidade, em comparação com os não lavados. Oshima & Ueda (1984), trabalhando com folhas de alfafa, produziram CPF precipitado com ácido (pH 4) e obtiveram um aumento semelhante, de 13,47% em proteína, quando tratou seu concentrado com etanol em comparação com o não tratado. A lavagem do CPFMC com etanol provocou um escurecimento na cor verde, porém, quando o CPFMA lavado ocorreu uma mudança na tonalidade de verde para amarronzado (Figura 5d e l, página 39).

A lavagem com acetona proporcionou um aumento de 20,33% de proteína e de 6,52% na digestibilidade do CPFMC (Tabela 5, página 49). A cor do CPFMC lavado (Figura 5 e) apresentou uma coloração verde bem mais clara que o não lavado (Figura 5a). A cor apresentada pelo CPFMC após essa lavagem foi semelhante à coloração verificada após lavagem com éter (Figura 5c).

Já para a lavagem do CPFMC com a mistura de acetona e hexano (CPFMCac/hex) o aumento foi de 14,83% em proteína e de 5,82% para a

digestibilidade protéica (Tabela 5). Verificou-se que o CPFMCac/hex (Figura 5f) ficou com uma tonalidade também semelhante à verificada após lavagem com éter (Figura 5c).

Quando o solvente de lavagem foi o hexano, houve um aumento de 4,55% de proteína e uma redução de 2,33% de digestibilidade ao ser comparado com o CPFMC não lavado (Tabela 5). Observou-se uma forte acentuação da cor verde (Figura 5g).

Já a lavagem do CPFMC com etanol 50% a quente 1x praticamente não alterou o teor de proteína, porém, ao ser lavado a quente 2x, ocorreu um aumento de 8,16% nesse mesmo teor. A digestibilidade protéica reduziu 13,07%, em média, ao ser comparada com o CPFMC não lavado (Tabela 5). Com esses dois processos de lavagem, não foi observada alteração na cor do CPFMC (Figura 5h e i).

4.5 Propriedades funcionais

A absorção de água da FFM (667,00%) foi maior que a dos CPFM (367,00%), possivelmente devido à maior presença de grupos hidrofílicos na FFM capazes de se ligar à água (Tabela 7). Fasuyi & Aletor (2005) encontraram uma média de 409,00% de absorção de água da FFM de quatro variedades e, para os CPFM precipitados com calor a uma temperatura entre 80°C e 90°C, encontraram um percentual que variou de 118,00% a 225,50%, utilizando uma metodologia semelhante à do referente trabalho.

TABELA 7 Absorção de água e de óleo da FFM, do CPFMC e do CPFMA.

Amostras ¹	Absorção de água (%)	Absorção de óleo (%)
FFM	667,00± 0,58	107,20± 0,29
CPFMC	367,00± 0,58	53,60± 0,28
CPFMA	367,00± 0,58	48,00± 0,17

Média de 3 repetições ± desvio padrão.

¹FFM: farinha de folhas de mandioca; CPFMC: concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor; CPFMA: concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido.

Aletor et al. (2002) encontraram uma variação de absorção de água de 149,10% a 471,50% para diferentes CPF de vegetais e afirmaram que eles são adequados para serem utilizados como ingredientes em alimentos viscosos como, por exemplo, em sopas e molhos. Fasuyi & Aletor (2005) observaram que tanto a FFM quanto os CPFM são indicados para atuar na formulação desse tipo de produto, devido à sua alta porcentagem de absorção de água, o que se repete no presente estudo.

A absorção de óleo também foi maior na FFM (107,20%) quando comparada com do CPFMC (53,60%) e com o CPFMA (48,00%) (Tabela 7). Fasuyi & Aletor (2005) encontraram uma absorção de óleo, para FFM, cujas folhas foram secas ao sol, de 56,80% e uma variação de 19,20% a 40,80% para o CPFMC. A absorção de óleo foi maior nas amostras do presente estudo. Essas diferenças são, provavelmente, devido à utilização de diferentes metodologias e cultivares.

A diminuição da absorção de óleo dos CPFM em comparação com a FFM pode estar relacionada com a hipótese de que a maior porcentagem de

fibras e a presença de outros fatores, além das proteínas, que são capazes de se ligarem ao óleo, são responsáveis por uma maior absorção (Pollonio, 1988).

Segundo Molina (1989), os CPFM apresentam boa capacidade de absorção de óleo e poderiam ser utilizados na formulação e processamento de alimentos envolvidos com a formação de emulsão e absorção de óleo. Como a absorção de óleo foi maior na FFM, possivelmente ela será mais adequada para incorporação na formulação de sopas, carnes e produtos de padaria que os CPFM.

Observa-se, no gráfico da Figura 6, que ocorreram variações nas porcentagens de solubilidade de nitrogênio, em função dos pH para cada amostra. A menor solubilidade de nitrogênio da FFM foi observada entre o pH 3 e 4 (47,39% a 48,22%) e a maior em pH 9 (88,73%). Fasuyi & Aletor (2005) observaram que a menor solubilidade de nitrogênio da FFM foi entre em pH 4 e 5, e a maior em pH alcalino (pH= 12).

Observou-se uma menor solubilidade de nitrogênio do CPFMC entre pH 3 e 5 (9,34% a 9,50%) e do CPFMA entre pH 3 e 6 (6,71% a 9,64%). A literatura revela uma menor solubilidade da proteína do CPFM obtido por termocoagulação ácida entre pH 2 e 6 (Molina, 1989) e para CPFMC entre pH 4 e 6 (Fasuyi & Aletor, 2005). Assim como no trabalho de Molina (1989), no presente estudo, os dois CPFM apresentaram maior porcentagem em pH alcalino (pH 9). O ponto isoelétrico das proteínas vegetais está entre pH 3 e 5, portanto, justifica a baixa solubilidade encontrada próxima a esta faixa de pH.

As duas formas de precipitação utilizadas neste estudo apresentaram pequenas diferenças em relação à solubilidade. Já Betschart (1974) verificou grandes diferenças em termos de solubilidade, dependendo do tipo de precipitação em seus CPF de alfafa, no qual o CPF precipitado a 80°C a pH 5,9 teve uma resposta bem inferior ao CPF precipitado com ácido em pH 3,5. Molina (1989) verificou uma solubilidade de nitrogênio do CPFM obtido por

termocoagulação ácida semelhante ao do presente trabalho, com valores inferiores a 20%, em uma faixa de pH que variou de 2 a 12.

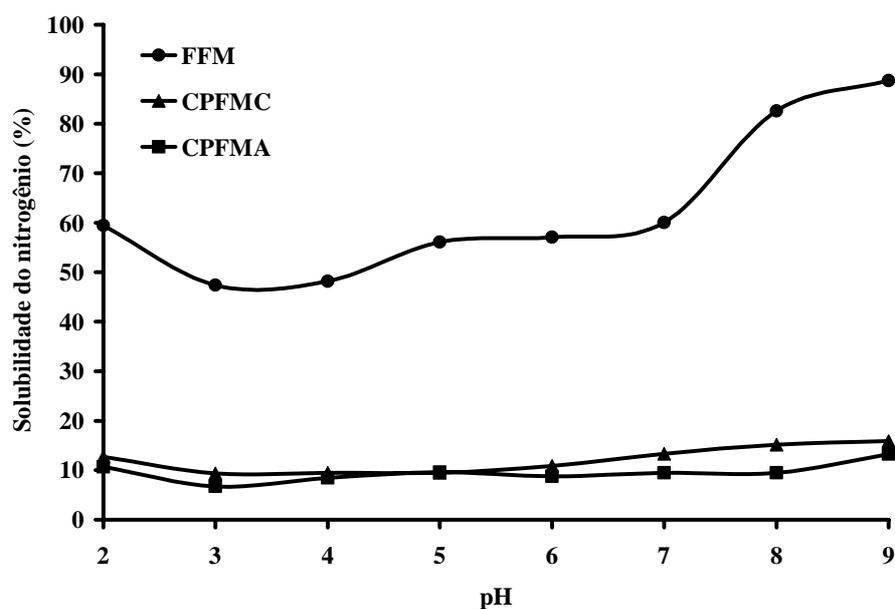


FIGURA 6 Solubilidade de nitrogênio em diferentes pH da farinha de folhas de mandioca (FFM), do concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor (CPFMC) e do concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido (CPFMA).

A solubilidade pode diminuir em consequência da desnaturação das proteínas e, possivelmente, essa seria uma das explicações de uma menor solubilidade dos CPFM em relação à da FFM.

Assim como no trabalho de Fasuyi & Aletor (2005), a FFM mostrou uma elevada solubilidade, tanto em pH 9 ($88,73 \pm 1,97\%$) quanto em pH 2

(59,49±2,60%). Portanto, seria provavelmente mais indicada para uma possível aplicação na produção de massas, sopas, produtos de padaria e confeitaria e em produtos ácidos, como bebidas carbonatadas ricas em proteínas (Oshodi & Ekperigin, 1989).

Na Tabela 8 está registrado o volume de espuma da FFM, do CPFMC e do CPFMA, após 30, 60 e 120 minutos em repouso. A FFM apresentou 78,57% de espuma aos 30 minutos após a agitação, havendo uma redução desse volume para 64,29% que se manteve até aos 120 minutos. Verificou-se que a FFM possuiu uma capacidade de formação e estabilidade de espuma mais elevada que a dos CPFMC. A estabilidade é importante para que se consiga manter uma espuma por um período de tempo maior possível (Aletor et al., 2002).

TABELA 8 Volume de espuma da FFM, do CPFMC e do CPFMA.

Amostras ¹	Volume de espuma (%) após		
	30 minutos	60 minutos	120 minutos
FFM	78,57±5,15	64,29±4,12	64,29±4,12
CPFMC	46,00±2,06	10,00±4,77	0,00±0,00
CPFMA	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,000

Média de 3 repetições ± desvio padrão.

¹FFM: farinha de folhas de mandioca; CPFMC: concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor; CPFMA: concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido.

O CPFMC apresentou 46,00% de espuma formada aos 30 minutos; aos 60 minutos, esse valor foi reduzido para 10,00% e aos 120 minutos, não havia mais espuma. Segundo Sangronis et al. (2004), o pH afeta a capacidade

espumante e esse efeito foi claramente mostrado pelo CPFMA que não apresentou formação de espuma durante e após a agitação, devido ao pH 4 de precipitação. Epstein (1985) não observou formação de espuma no isolado protéico de feijão bravo em pH 4,5, fato semelhante ao CPFMA deste trabalho.

Como os CPFM possuem uma maior porcentagem em proteína que a FFM, esperaria-se uma formação de espuma mais estável ao decorrer do tempo, pois as proteínas atuam como estabilizantes de espumas (Pollonio, 1988). Uma explicação pela menor quantidade de espuma formada nos CPFM seria a maior porcentagem de lipídeos (17,39 g/100g MS) em relação à FFM (12,52 g/100g MS). Pollonio (1988) mencionou que a presença de lipídeos contribuiu para a menor formação de espuma e estabilidade de seu isolado protéico de semente pura de tomate, em comparação aos isolados protéicos obtidos do resíduo industrial do processamento de tomate. Segundo Fennema (1993), a presença de lipídeos em excesso pode reduzir a formação e a estabilidade de espuma devido à alteração da expansão da proteína à interface e enfraquecimento ou rompimento das forças coesivas necessárias entre a camada de proteína em torno dos glóbulos de ar, tendo por consequência o colapso de espuma.

A estabilidade é importante em formulações onde se requeira a formação de espuma, como suspiros, merengues, mousses e bolos (Fennema, 1993; Okezie & Bello, 1988).

Na FFM, foi observada uma redução do volume de espuma e um aumento do volume de óleo, tendo a quantidade de água se mantido após 2 horas e, em seguida, ocorreu um pequeno aumento (Tabela 9). Nos CPFM, o volume de espuma reduziu e o de óleo e água aumentou após 6 horas, diferindo apenas nos volumes registrados para cada CPFM.

Tanto a FFM quanto os CPFM não apresentaram boa estabilidade de emulsão. Molina (1989) observou uma maior estabilidade de emulsão em CPFM obtido por ultrafiltração em relação ao obtido por termocoagulação ácida. Esse

autor atribuiu a alta atividade emulsificante do CPFM por ultrafiltração à desnaturação das proteínas que é muito maior nessa técnica quando comparada à termocoagulação.

Alguns autores mencionam que há uma relação entre as propriedades funcionais, outros discordam; eles acreditam que haja apenas uma interferência da estrutura e da conformação da proteína. A presença de carga iônica e de constituintes não protéicos pode afetar as propriedades emulsificantes (Beuchat, 1977).

TABELA 9 Estabilidade de emulsão da FFM, do CPFMC e do CPFMA

Parâmetros	Tempo (h)	FFM ¹	CPFMC ²	CPFMA ³
Espuma (mL)	0,5	11,50±0,28	17,00±0,87	10,00±0,29
	2	11,00±0,28	13,00±0,87	8,50±0,00
	6	10,00±0,29	11,50±0,00	8,50±0,28
Óleo (mL)	0,5	3,50±0,28	0,00±0,00	4,00±0,58
	2	4,00±0,28	1,00±0,00	4,50±0,87
	6	4,50±0,00	1,50±0,0,29	4,50±0,50
Fase aquosa (mL)	0,5	5,00±0,58	3,00±0,00	6,00±0,00
	2	5,00±0,58	6,00±0,00	7,00±0,00
	6	5,50±0,50	7,00±0,58	7,00±0,50

Média de 3 repetições ± desvio padrão.

¹FFM: farinha de folhas de mandioca; ²CPFMC: concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com calor; ³CPFMA: concentrado protéico de folhas de mandioca precipitado com ácido.

Há uma grande dificuldade em se comparar os resultados da estabilidade de emulsão com os da literatura, devido à falta de padronização da metodologia e das condições para se obter as características de uma emulsão, pois elas estão associadas à influência de diversos fatores como pH, temperatura, tipo e geometria de aparelho utilizado, velocidade de adição de óleo e propriedades emulsificantes das proteínas.

De modo geral, a forma de avaliação e a medida das propriedades funcionais são muito diferentes, não havendo ainda uma perfeita padronização das metodologias utilizadas, o que dificulta a comparação dos dados.

5 CONCLUSÕES

Constatou-se que a forma de precipitação utilizada na obtenção dos concentrados protéicos de folhas de mandioca (CPFM) não apresentou diferenças em relação aos constituintes químicos analisados. Entretanto, em relação à cor dos concentrados, o obtido pela precipitação com calor apresentou uma tonalidade verde mais clara.

A obtenção dos CPFMs acarretou um aumento médio de 57,72% no teor de proteína bruta e de 93,55% na digestibilidade protéica, além de ter ocasionado redução nos níveis de cianeto, saponina e polifenóis.

As lavagens dos concentrados protéicos com solução de etanol 50% e éter não acarretaram melhorias na digestibilidade protéica, apesar de ter reduzido os níveis dos antinutrientes. Todavia, a lavagem com éter clareou a cor verde dos CPFMs.

Os solventes de lavagem que acarretaram um maior aumento na digestibilidade protéica foram a acetona e a mistura de acetona e hexano (1:1,5) e também proporcionaram um maior clareamento do tom verde do concentrado.

Os CPFMs apresentaram boa capacidade de absorção de água e de óleo, baixa solubilidade de nitrogênio e má estabilidade de emulsão e formação de espuma.

6 PERSPECTIVAS

Avaliar outras propriedades funcionais dos CPFM para possível adição em alimentos, como viscosidade e gelatinização.

Realizar lavagens nas folhas de mandioca com solventes orgânicos antes da extração de proteínas para a obtenção de CPFM, com a finalidade de reduzir os antinutrientes e melhorar ainda mais a digestibilidade protéica.

Determinar teores de antinutrientes nos CPFM lavados com acetona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKESON, W. R.; STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 83, n. 3, p. 257-261, 1964.
- ALETOR, V. A.; ADEOGUN, O. A. Nutrient and antinutrient components of some tropical leafy vegetables. **Food Chemistry**, Oxford, v. 53, n. 3, p. 375-379, 1995.
- ALETOR, O.; OSHODI, A. A.; IPINMOROTO, K. Chemical composition of common leaf vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates. **Food Chemistry**, Oxford, v. 78, n. 1, p. 63-68, July 2002.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of the analytical chemists**. 16. ed. Washington, 1995.
- BACCOU, J. C.; LAMBERT, F.; SAUVAIRE, Y. Spectrometric method for the determination of total steroidal sapogenin. **Analyst**, London, v. 102, n. 1215, p. 458-465, 1977.
- BESTCHART, A. A. Nitrogen solubility of alfalfa protein concentrate as influence by various factors. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 39, n. 6, p. 1111-1115, Nov./Dec. 1974.
- BEUCHAT, L. R. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 25, n. 2, p. 258-261, Mar./Apr. 1977.
- CALDERÓN de la BARCA, A. M.; OCHOA, J. L.; VALENCIA, M. E. Effect of extraction of a hemagglutinin on the nutritive value of amaranthus leucocarpus seeds. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, p. 1700-1772, 1985.
- CARLSSON, R. Quantity and quality of leaf protein concentrates from *Atriplex hortensis* L., *Chenopodium quinoa* Willd. and *Amaranthus caudatus* L., grow in southern Sweden. **Acta Agriculture Scandinavica**, Stockholm, v. 30, n. 4, p. 418-430, 1980.

CARLSSON, R.; BARBOSA, C. F.; AMORIM, C. Effect of processing conditions on the composition and nutritive value on leaf protein concentrates from *Pennisetum purpureum* cv napier. **Current Trends in Life Science**, New Delhi, v. 11, p. 209-219, 1984.

CARLSSON, R.; HANCZAKOWSKI, P.; ISRAELSEN, M. New forage crops for wet-fractionation to produce leaf protein concentrates. **Rocznik Naukowe Zootechniki**, Krakow, v. 9, p. 263-270, 1982.

CARVALHO, V. D.; KATO, M. S. A. Potencial de utilização da parte aérea da mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 145, p. 23-28, jan. 1987.

CHAVES, J. G. Extrato protéico das folhas de mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 145, p. 47-52, jan. 1987.

CHAVEZ, A. L.; BEDOYA, J. M.; SÁNCHEZ, T.; IGLESIAS, C.; CEBALLOS, H.; ROCA, W. Iron, carotene, and ascorbic acid in cassava roots and leaves. **Food and Nutrition Bulletin**, Tokyo, v. 21, n. 4, p. 410-413, 2000.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**. Bioquímica. Propiedades funcionales. valor nutritivo. Modificaciones químicas. Zaragoza: Editora Acribia, 1989. p. 346.

CORRÊA, A. D.; ESPÍNDOLA, F. S. Concentrado protéico de folhas (CPF) de *Xanthosoma sagittifolium* Schott (taioba): determinação do teor em proteínas, em aminoácidos e em polifenóis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 9., 1986, Curitiba.

CORRÊA, A. D.; ESPÍNDOLA, F. S.; TANAKA, T. N.; PIAU JÚNIOR, R. Comparative study of various methods of leaf protein extraction and precipitation. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON LEAF PROTEIN RESEARCH LEAF-PRO 89, 3., 1989, Pisa- Perugia - Viterbo. **Proceedings...** Pisa-Perugia – Viterbo, 1989a.

CORRÊA, A. D.; ESPÍNDOLA, F. S.; TANAKA, T. N.; PIAU JÚNIOR, R. Influence of the age of plants producing leaf protein concentrate. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON LEAF PROTEIN RESEARCH LEAF-PRO 89, 3., 1989, Pisa- Perugia - Viterbo. **Proceedings...** Pisa- Perugia – Viterbo, 1989b.

CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D.; NATIVIDADE, M. A. E.; ABREU, C. M. P.; XISTO, A. L. R. P.; CARVALHO, V. D. Farinha de folhas de mandioca I - Efeito de secagem das folhas sobre a atividade da linamarase. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 368-374, mar./abr. 2002.

CORRÊA, A. D.; SANTOS, S. R.; ABREU, C. M. P.; JOKL, L.; SANTOS, C. D. Remoção de polifenóis da farinha de folhas de mandioca. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 159-164, abr./jun. 2004.

D' ALVISE, N.; LESUEUR-LAMBERT, C.; FERTIN, B.; DHULSTER, P.; GUILLOCHON, D. Hydrolysis and large scale ultrafiltration study of alfafa protein concentrate enzymatic hydrolysate. **Enzyme and microbial Technology**, New York, v. 27, n. 3/5, p. 289-294, Aug. 2000.

DAHNIYA, M. T.; OPUTA, C. O.; HAHN, S. K. Effects of harvesting frequency on leaf and root yields of cassava. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 17, n. 1, p. 91-95, Jan. 1981.

DANTAS-BARROS, A. M. D. **Variação de nitrogênio, aminoácidos, fatores antinutricionais e digestibilidade *in vitro* em leguminosas, durante fases de desenvolvimento e nos concentrados protéicos de folhas**. 1984. 135 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DERENZO, S.; ALDEIA, W. Estudo das condições operacionais da etapa de extração de proteína do capim elefante (*pennisetum purpureum schum*), utilizado como fonte energética. In: ENCONTRO DE ENERGIA DO MEIO RURAL, 3., 2000, Campinas. **Anais...** Campinas, 2000.

EL-DASH, A.; MAZZARI, R.; GERMANI, R. **Tecnologia de farinhas mistas: uso de farinha mista de trigo e mandioca na produção de pães**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. v. 1, 88 p.

EPSTEIN, M. **Caracterização química do feijão branco (*Canavalia brasiliensis, mart.*) e propriedades nutricionais e funcionais do seu isolado protéico**. 1985. 83 p. Tese (Doutorado) -Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ESPÍNDOLA, F. S. **Fracionamento dos vegetais verdes e obtenção de concentrados protéicos de folhas (CPF) para suplementação de alimentos e ração animal, com o aproveitamento de subprodutos**. 1987. 130 p. Monografia Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

FARFÁN, J. A. **Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia dos alimentos**. Campinas: Unicamp, 1990.

FASAKIN, E. A. Nutrient quality of leaf protein concentrates produced from water fern (*Azolla africana* Desv) e duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L. Schleiden. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 69, n. 2, p. 185-187, Aug. 1999.

FASUYI, O. A. Nutritional evaluation of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) leaf protein concentrates (CLPC) as alternative protein sources in rat assay. **Pakistan Journal of Nutrition**, Faisalabad, v. 4, n. 1, p. 50-56, Jan. 2005.

FASUYI, O. A.; ALETOR, V. A. Varietal composition and functional properties of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) leaf meal and leaf protein concentrates. **Pakistan Journal of Nutrition**, Faisalabad, v. 1, n. 1, p. 43-49, Jan. 2005.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. 1095 p.

FONSECA, S. V.; VIEIRA, C.; MININ, V. P. R.; CARDOSO, A. A. Folhas verdes de feijão na alimentação humana: avaliação sensorial, adubação nitrogenada e desfolhamento. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 161-167, maio/ago. 2002.

FRANCO, G. V. E. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 307 p.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, M. F. Inativação dos inibidores de proteases de leguminosas: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, v. 34, n. 2, p. 107-112, jul./dez. 2000.

GIDAMIS, A. B.; O'BRIEN, G. M.; POULTER, N. H. Cassava detoxification of traditional Tanzanian cassava foods. **International Journal Food Science Technology**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 211-218, Apr. 1993.

GLÓRIA, M. M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha do Pará: obtenção e caracterização química e funcional. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 240-245, maio/ago. 2000.

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 371-383, 1963.

HEINEMANN, R. B.; COSTA, N. M. B.; CRUZ, R.; PIROZI, M. R. Valor nutricional de farinha de trigo combinada com concentrado protéico de folha de mandioca. **Revista de Nutrição de Campinas**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 51-57, 1998.

HERNÁNDEZ, A.; HERNÁNDEZ, T.; MARTÍNEZ, C. Production and chemical composition of alfafa protrein concentrate obtained by freezing. **Animal Feed Science and Technology**, Amserdam, v. 72, n. 1/2, p. 169-174, May 1998.

IKEDIABI, C. O.; ONYIA, G. O. C.; ELUWAH, C. E. A rapid and inexpensive enzymatic assay for total cyanide in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and cassava products. **Agricultural and Biological Chemistry**. Tokyo. v. 44, n. 12, p. 2803-2809, Dec. 1980.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy product: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, St Paul, v. 51, n. 3, p. 376-682, May/June 1974.

KAKADE, M. L.; SIMONS, N.; LIENER, I. E. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal Chemistry**, St Paul, v. 46, n. 5, p. 518-526, Sept./Oct. 1969.

KOSCHUH, W.; POVODEN, G.; THANG, V. H.; KROMUS, S.; KULBE, K. D.; NOVALIN, S.; KROTSCHHECK, C. Production of leaf protein concentrate from ryegrass (*Lolium perene x multiflorum*) and alfafa (*Medicago sativa subsp. Sativa*). Comparison between heat coagulation/centrifugation and ultrafiltration. **Desalination**, Amsterdam, v. 163, n. 1/3, p. 253-254, Mar. 2004.

LANCASTER, P. A.; IGRAM, M. Y.; LIM, M. Y.; COURSEY, D. G. Traditional cassava-based foods: survey of processing techniques. **Economic Botany**, Bronx, v. 36, n. 1, p. 12-45, 1982.

LOREZI, J. O.; DIAS, C. A. C. Cultura da mandioca. **Boletim Técnico CATI**, Campinas, n. 211, p. 41, 1993.

MADRUGA, M. S.; CÂMARA, F. S. The chemical composition of multimistura as a food supplement. **Food Chemistry**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 41-44, Jan. 2000.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.

MEDEIROS, R. M. L.; SABAA SRUR, A. U. O.; PINTO, C. L. R. Estudo da biomassa de aguapé, para a produção do seu concentrado protéico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 226-230, maio/ago. 1999.

MELO, D. S. **Farinha de folhas de mandioca: efeitos sobre a peroxidação e o perfil lipídico plasmático e hepático de ratos**. 2005. 74 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MENDONÇA, H. A.; MOURA, G. M.; CUNHA, E. T. Avaliação de genótipos de mandioca em diferentes épocas de colheita no estado do Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 6, p. 761-770, jun. 2003.

MOLINA, C. R. **Caracterização bioquímica e nutricional de concentrado protéico de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) obtido por ultrafiltração**. 1989. 199 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MOTTA, J. S.; FUKUDA, W. M. G.; SOUZA, L. C. B.; COSTA, Z. M. F. A farinha da folha de mandioca: uma alternativa como complemento alimentar. **Mandioca em Foco**, Cruz das Almas, v. 4, p. 1-2, 1994.

NATIVIDADE, M. A. E. **Estudo químico e nutricional do concentrado protéico de folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) obtido por termocoagulação**. 1992. 149 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OHSHIMA, M. The second limiting amino acid of ladino clover LPC in rats. **Japanese Journal of Zootechnical**, Tokyo, v. 56, n. 3, p. 123-129, 1985.

OHSHIMA, M.; UEDA, H. Effects of some treatments on the yield and the nutritive value of lucerne leaf protein concentrate. **Japanese Journal of Zootechnical**, Tokyo, v. 55, n. 8, p. 584-590, Aug. 1984.

OKEZIE, B. O.; BELLO, A. B. Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, n. 2, p. 450-454, Mar./Apr. 1988.

ORTEGA-FLORES, C. I.; COSTA, M. A. I.; CEREDA, M. P.; PENTEADO, M. V. C. Avaliação da qualidade protéica da folha desidratada de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 47-59, jun. 2003.

OSHODI, A. A.; EKPERIGIN, M. M. Functional properties of pigeon pea (*Cajanus cajan*) flour. **Food Chemistry**, Oxford, n. 3, p. 187-191, 1989.

PADMAJA, G. Evaluation of techines to reduce assayable tannin and cyanide. . + in cassava leaves. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 37, n. 4, p. 712-716, Oct. 1989.

PEREIRA, G. I. S.; PEREIRA, R. G. F. A; BARCELOS, M. F. P.; MORAIS, A. R. Avaliação química da folha de cenoura visando seu aproveitamento na alimentação humana. **Ciências e Agrotécologia**, Lavras, v. 27, p. 852-857, jul./ago. 2003.

PINTO, N. A. V. D.; FERNANDES, S. M.; PATRÍCIA, M. P.; CARVALHO, V. D. Variabilidade da composição centesimal, vitamina C, ferro e cálcio de partes da folha de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v. 7, n. 3, p. 205-208, set./dez. 2001.

PIRIE, N. W. **Leaf protein and its By-products on human and animal nutrition**. 2. ed. London: Cambridge University Press, 1987.

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

POLLONIO, M. A. R. **Estudo das propriedades funcionais do isolado protéico obtido do resíduo industrial do processamento de tomate**. 1988. 171 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RAVINDRAN, G.; RAVINDRAN, V. Changes in the nutritional composition of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves during maturity. **Food Chemistry**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 299-309, 1988.

RAVINDRAN, V. Cassava leaves as animal feed: potential and limitations. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, London, v. 61, n. 2, p. 141-150, 1993.

RAVINDRAN, V.; RAJAGURU, A. S. B. Effect of stem pruning on cassava root yield and leaf growth. **Journal Agricultural Science**, New York, v. 25, n. 1, p. 32-37, 1988.

- REED, J. D.; McCOWELL, R. E.; VAN SOEST, P. J.; HORVATH, P. J. Condensed tannins: a factor limiting the use of cassava forage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 33, n. 3, p. 213-220, Mar. 1982.
- ROGERS, D. J.; MILNER, M. Amino acid profile of manioc leaf protein in relation to nutritive value. **Economic Botany**, New York, v. 17, n. 4, p. 211-217, 1963.
- ROSS, E.; ENRIQUEZ, F. Q. The nutritive value of cassava leaf meal. **Poultry Science**, Champaign, v. 48, n. 3, p. 846-853, May 1969.
- SAGRILO, E.; VIDIGAL FILHO, P. S.; PEQUENO, M. G.; SCAPIM, C. A.; VIDIGAL, M. C. G.; DINIZ, S. P. S. S.; MODESTO, E. C.; KVITSCHAL, M. V. Effect of harvest period on the quality of storage roots and protein content on the leaves in five cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 2, p. 295-305, Apr./June 2003.
- SALGADO, J. S.; SANTOS, A. C. Estudo do concentrado protéico de folhas de mandioca, obtenção, análise química e suplementação com aminoácidos. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 36, n. 3, p. 483-494, 1986.
- SANGRONIS, E.; MACHADO, C.; CAVA, R. Propriedades funcionales de las harinas de leguminosas germinadas. **Interciencia**, Caracas, v. 29, n. 2, p. 80-85, feb. 2004.
- SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Solubilization and electrophoretic characterization of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins. **Journal of Food Science**, Logan, v. 46, n. 1, p. 82-87, 1981.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: _____. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS/Florianópolis: UFSC, 1999. 821 p.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.
- SILVA, D. J. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. Viçosa: UFV, 1990. 166 p.

SZYMCZYK, B.; GWIAZDA, S.; HANCZAKOWSKI, P. Nutritive value for rats of unextracted and defatted green fractions of leaf protein concentrate from red clover. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 56, n. 1/2, p. 169-175, Nov. 1995.

TANGKA, J. K. Analysis of the thermal energy requirements for the extraction of leaf protein concentrate from some green plants. **Biosystems Engineering**, San Diego, v. 86, n. 4, p. 473-479, Dec. 2003.

URRIBARRÍ, C. L.; FERRER, O. A.; COLINA, A. Extracción y precipitación de las proteínas solubles del pasto elefante enano (*Pennisetum purpureum* Schum cv. Mott). **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, v. 21, n. 3, p. 264-275, 2004.

VIEIRA, E. C. Leaf protein research in Brazil. In: TELEK, L.; GRAHAM, H. D. (Ed.). **Leaf Protein Concentrates**. Westport: USA, 1983. p. 661-668.

VIEIRA, E. C.; GAZZINELLI, G.; MARES-GUIA, M. **Bioquímica celular e biologia molecular**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 360 p.

WANG, S. H.; CABALLERO-CORBOBA, G. M.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de misturas de farinhas de trigo e soja-desengordurada, pré-tratada por microondas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 14-25, jan./jun. 1992.

WOBETO, C. **Nutrientes e antinutrientes da farinha de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em três idades da planta**. 2003. 82 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.