

ESTUDO DO CONCENTRADO PROTEICO DA FOLHA DE MANDIOCA. OBTENÇÃO, ANÁLISES QUÍMICAS E SUPLEMENTAÇÃO COM AMINOÁCIDOS

Jocelem Mastrodi Salgado¹ e Avany Corrêa Santos²

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ)
Universidade de São Paulo,
São Paulo, Brasil

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo obter um concentrado proteico de folhas de mandioca através de modificações na metodologia já existente. O valor nutricional da folha de mandioca e do concentrado proteico foi avaliado através de análises químicas, ensaio biológico e suplementação da proteína tanto do concentrado como da folha com os aminoácidos limitantes lisina e metionina.

Dos resultados obtidos foram sugeridas as seguintes conclusões:

- A folha de mandioca e o concentrado proteico da folha apresentaram um teor proteico elevado, 25,20% e 34,0%, respectivamente.
- Ensaio biológico tanto do concentrado como da folha com o aminoácido lisina mais metionina mostrou ser eficiente, dando maiores valores para PER, NPU e digestibilidade.
- A adição do aminoácido lisina não mostrou ter nenhum efeito significativo na melhora do valor nutricional da proteína.
- Exames anátomo patológico dos órgãos dos animais não revelaram nenhuma alteração, indicando não haver fatores tóxicos na folha e no concentrado.

INTRODUÇÃO

Aumentar o suprimento da proteína para o consumo humano tem sido a preocupação de muitos pesquisadores. Constitui uma tarefa difícil prin-

Manuscrito modificado recebido: 2-6-86.

¹ Professor Adjunto, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Departamento de Química, Área de Nutrição Humana, Piracicaba - CEP - 13.400, São Paulo, Brasil.

² Professor Assistente Doutor, Departamento de Química - Área de Nutrição Humana, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

principalmente se considerar as dificuldades da produção da proteína animal em termos econômicos e políticos.

Portanto um aumento na produção e utilização das fontes de proteína vegetal está mais de acordo com a realidade. Os esforços mais recentes, consistem em melhoramentos genéticos das fontes convencionais, utilização das fontes não convencionais e procura de novas fontes como de folhas verdes e organismos unicelulares. Destas os concentrados proteicos de folhas tem merecido particular atenção devido ao baixo custo de produção, elevado valor nutritivo e disponibilidade durante o ano todo. A proteína de folha tem elevado teor de lisina e triptofano; por isso seu emprego pode ser um suplemento benéfico de dietas à base de cereais (1-3).

A mandioca é um alimento básico para o consumo humano em algumas regiões do Brasil *in natura* ou processada, sendo que parte da produção é utilizada na alimentação animal e no Programa Nacional do Alcool, para produção de energia alternativa, quando a fécula é convertida em etanol.

Se considerada integralmente (raiz, haste e folha), a mandioca é uma planta rica do ponto de vista alimentar. Mas sua riqueza potencial é muito pouco aproveitada pois as folhas são muito mais ricas em proteínas do que as raízes; o teor de proteínas nas folhas é em torno de 14^o/o, enquanto que a parte amilácea é de 1 a 2^o/o (4). Embora as folhas contêm menos metionina que a raiz, os níveis de outros aminoácidos essenciais excedem o padrão de referência pela FAO (5).

Como o homem não está equipado biologicamente para digerir células de folhas, especialmente suas paredes de celulose, a produção de concentrados é a melhor solução para aproveitar a proteína folhear, visando completar a alimentação humana.

Vários métodos tem sido descritos para a obtenção de concentrados proteicos a partir de folhas. Edwards *et alii* (6), Miller e Bender (7) e Parrish (8), descreveram sequências de operações de processamento do concentrado proteico de folhas de alfalfa. Fafunso e Oke (9, 10) extraíram proteína de 15 litros de mandioca em precipitação a 80°C. Cheeke *et alii* (11) estudaram o valor de concentrados preparados da seleção de plantas tropicais através da extração do suco de plantas verdes e coagulação da proteína solúvel no suco. Esses pesquisadores não obtiveram resultados satisfatórios na utilização do concentrado proteico de folhas de mandioca avaliado através de ensaio biológico.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

1. Obter um concentrado proteico da folha de mandioca em maiores proporções daqueles obtidos pelos métodos tradicionais através de modificações existentes.
2. Estudar o concentrado sob ponto de vista de assimilação ou absorção pelas células intestinais (digestibilidade) e do ponto de vista químico.
3. Suplementar o concentrado proteico com os aminoácidos limitantes.

MATERIAIS E METODOS

Matéria Prima

As folhas que foram utilizadas para o experimento foram coletadas de mandioca amarela (*Manihot utilissima*, Pohl), cultivadas na área pertencente ao Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" ESALQ.

Preparo das folhas de mandioca — As folhas de mandioca foram pesadas, lavadas e postas para secar em estufa de circulação forçada a 60°C até atingir peso constante.

Métodos

Extração da Proteína — Foram testados quatro métodos de extração da proteína que resumidamente constituem no seguinte:

Método 1 — *Com acerto de pH e sem centrifugação* — A extração foi feita com água em liquidificador industrial. As folhas foram lavadas com água deionizada e homogeneizadas com 3 (três) volumes de água por 10 (dez) minutos. O pH foi ajustado para 7 com NaOH 0.1N e o suco, filtrado através de gaze a fim de remover as fibras. As fibras residuais foram homogeneizadas com 2 (dois) volumes de água e o tratamento repetido. Os filtrados foram misturados e passados através de peneira mesh-200. O pH foi ajustado para 4 com HCL 0.1N. O aquecimento a 50°C facilitou a precipitação da proteína. Após a precipitação, o material ficou em repouso durante uma noite a 4°C, a suspensão foi filtrada e o resíduo seco a 60°C, em estufa de circulação forçada. Após secagem o material foi moído e armazenado a -20°C.

Método 2 — *Sem acerto de pH e sem centrifugação* — As folhas verdes após lavadas foram homogeneizadas por 10 (dez) minutos em liquidificador industrial. O homogeneizado foi filtrado, através de tecido de algodão. O suco filtrado foi aquecido a 60-65°C, a fim de coagular a proteína. A proteína coagulada foi deixada esfriar em temperatura ambiente.

Após esfriar, o coagulado foi filtrado a fim de separar a proteína. Lavou-se o precipitado com água quente a fim de remover resíduos que aderem ao papel de filtro. Após a lavagem o material foi levado para secar a 60°C em estufa de circulação forçada, moído e armazenado a -20°C.

Método 3 — Exatamente igual ao método 1, exceto que após o repouso de uma noite a 4°C foi centrifugado por 10 (dez) minutos a 3,000 rpm e essa centrifugação foi repetida 5 (cinco) vezes com H₂O deionizada. Após secagem e moagem o material foi armazenado a -20°C.

Método 4 — Exatamente como descrito no método 2, exceto que o material após coagulação e esfriamento à temperatura ambiente foi centrifugado a 3,000 rpm por 10 (dez) minutos. Essa centrifugação foi repetida 5 (cinco) vezes com H₂O deionizada. Após isso, o material foi posto para secar em estufa de circulação forçada a 60°C e após seco foi moído e armazenado a -20°C.

Análises

Foram feitas análises de proteína e aminograma nos concentrados obtidos pelos 4 métodos descritos acima. No concentrado obtido pelo método escolhido para o presente trabalho, além dessas análises foram obtidos valores para umidade, matéria seca, extrato etéreo, fibra bruta e cinzas, segundo os métodos tradicionais da AOAC, 1970 (12).

O perfil de aminograma foi determinado em analisador automático (Beckman Urichron Amino Acid Analyzer) pela hidrólise ácida usando-se as técnicas descritas para esse tipo de análises.

Ensaio Biológico

Preparo das dietas — As dietas experimentais e de controle foram formuladas ao nível de 100% e constituída de mistura salina (40%), mistura vitamínica (10%), óleo de milho (80%) e amido para completar 100.

Foram feitas 9 (nove) dietas experimentais, ou seja: controle (caseína), folha de mandioca, folha + 0.5 metionina, folha + 0.7 lisina, folha + 0.7 lisina + 0.5 metionina, concentrado, concentrado + 0.5 metionina, concentrado + 0.7 de lisina, concentrado + 0.5 metionina + 0.7 de lisina. Inclui-se uma dieta aprotéica a fim de corrigir a proteína consumida e eliminada para fins de cálculo da digestibilidade. Amostras dessas dietas foram submetidas a análise química.

Animais

Para a análise biológica, utilizou-se 60 ratos (*Rattus norvegicus*), variedade albinus, da raça Wistar, procedentes do Biotério do setor de Nutrição Humana da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ, cuja idade variou de 21-23 dias e a variação do peso entre os animais, bem como entre os grupos não excedeu 5 gramas.

A experiência teve 28 dias de duração; os ratos foram colocados em gaiolas individuais recebendo água e alimento *ad libitum*. Os animais foram pesados três vezes por semana. As fezes excretadas por animal foram coletadas, pesadas, postas para secar em estufa de circulação forçada à 105°C, durante 3 dias, moídas e armazenadas em sacos plásticos em refrigerador. As amostras das fezes foram analisadas para verificar o teor de nitrogênio de acordo com os métodos AOAC, 1970, a fim de calcular a digestibilidade.

Ao final do experimento, após jejum de 12 horas os animais foram sacrificados, as cavidades abdominais e torácicas abertas e colocadas na estufa à 105°C, durante 72 horas.

As carcaças secas foram moídas em liquidificador tipo industrial, armazenadas em sacos plásticos e mantidas sob refrigeração, para determinação da utilização da proteína líquida (NPU).

Os métodos baseados no crescimento do animal foram: PER (Protein efficiency ratio) de acordo com a metodologia de AOAC (1970). Digestibilidade, NPU (utilização da proteína líquida) e valor biológico segundo Miller e Bender (7).

Teste de Toxidez

Para verificar a toxidez da folha de mandioca, do concentrado, da folha e do concentrado suplementado com lisina, e lisina mais metionina, foram utilizados 60 (sessenta) animais, sendo 10 (dez) para cada dieta que receberam água e alimento *ad libitum*, durante 30 (trinta) dias.

Ao final do experimento, os animais foram sacrificados, e foi feita observação microscópica dos órgãos.

Para estudo anátomo patológico, amostras de órgãos como fígado, baço, rins, intestino grosso e delgado, coração, pâncreas e pulmões foram removidos, conservados em formol a 10^o/o e enviados para o Laboratório de Análise Patológica, para exames histopatológicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 indica os valores da proteína obtida pelos 4 métodos testados para obtenção do concentrado proteico. Os valores do aminograma aparecem dispostos na Tabela 2.

TABELA 1

VALORES PROTEICOS OBTIDOS NOS DIFERENTES METODOS PARA OBTENÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO

Método	Proteína ^o /o
1	25.1
2	32.5
3	27.9
4	37.1

Pelos resultados da Tabela 1, observa-se que o concentrado obtido pelo método 4, ou seja, da coagulação da proteína pelo calor sem acerto de pH e com 5 (cinco) lavagens sucessivas do precipitado com água deionizada, foi que deu maior teor proteico. Provavelmente essa lavagem tenha removido algumas impurezas e concentrado a proteína.

Embora esse método tenha dado um maior valor proteico, optamos pelo método 2, que embora com menor valor proteico, foi mais simples e de mais rápida execução.

Os resultados da análise química da folha de mandioca e do concentrado proteico da folha obtida pelo método 2, aparecem dispostos na Tabela 3.

Segundo o valor proteico da folha de mandioca e do concentrado da folha, foram elaboradas as dietas experimentais ao nível de 10^o/o.

A Tabela 4, indica a composição percentual das dietas experimentais, de controle e aprotéica por cálculos e pela análise química.

TABELA 2
COMPOSIÇÃO DE AMINOACIDOS DE CONCENTRADO PROTEICO DE FOLHAS DE MANDIOCA OBTIDO
POR DIFERENTES MÉTODOS E EXTRAÇÃO
g/100 g de proteína

Métodos p/obten. concent.	Lis	His	Arg	Ac. asp.	Tre	Ser	Ac. glu.	Pro	Gli	Ala	Val	Iso	Leu	Tir	Fen	Cis	Met
1	5.5	2.53	7.7	18.2	7.0	7.3	21.1	6.6	9.4	8.7	6.5	5.3	15.5	6.4	7.4	0.8	1.7
2	7.2	2.6	8.3	19.8	6.8	7.3	22.0	6.5	9.3	8.8	6.4	4.9	14.7	5.3	7.8	1.4	2.5
3	8.9	3.3	11.6	26.6	10.3	10.1	29.0	9.1	15.1	13.5	9.2	7.8	26.9	8.7	10.6	1.5	2.3
4	5.8	2.2	8.0	16.1	6.5	6.3	18.0	6.6	9.1	8.1	6.5	4.9	15.6	6.3	7.1	0.8	1.9

Lis = Lisina

His = Histidina

Arg = Arginina

Ac. asp. = Acido aspártico

Tre = Treonina

Ser = Serina

Ac. glu. = Acido glutâmico

Pro = Prolina

Gli = Glicina

Ala = Alanina

Val = Valina

Iso = Isoleucina

Leu = Leucina

Tir = Tirosina

Fen = Fenilalanina

Cis = Cistina

Met = Metionina

TABELA 3

ANALISE QUIMICA DA FOLHA DE MANDIOCA E DO CONCENTRADO DA FOLHA

Análises	Folha mandioca	Concentrado folha mandioca
Matéria seca	91.1	90.6
Extrato etéreo	10.4	14.3
Fibra bruta	8.1	1.0
Proteína	25.2	34.0
Cinzas	6.78	5.18

A Tabela 6 indica um resumo das análises biológicas, baseadas no crescimento dos animais (PER) e na retenção do nitrogênio (Digestibilidade, NPU e valor biológico).

A folha de mandioca e o concentrado proteico da folha apresentaram um teor proteico de 25, 2, e 340/o, respectivamente. Embora esse valor proteico não seja tão baixo; os dados do ensaio biológico revelaram ser essas proteínas de baixo valor nutricional.

Pelos resultados da Tabela 6, observa-se que quando a folha e o concentrado proteico da folha foram usados como única fonte proteica, os animais perderam peso. Quando o concentrado da folha e a folha de mandioca foram fortificados com metionina, a taxa de eficiência proteica (PER), pode ser medida.

A adição do aminoácido lisina, em quantidade assinalada na Tabela 6, não desempenhou nenhuma ação corretiva, indicando ser um aminoácido limitante, mas não o primeiro limitante e sim limitante secundário.

Quando se adicionou lisina mais metionina, os resultados foram melhores do que com o acréscimo de metionina somente, indicando ter havido uma complementação entre esses dois aminoácidos e o padrão de aminoácidos da proteína da folha como do concentrado proteico melhorando a taxa de eficiência proteica (PER).

A fortificação com metionina, e metionina mais lisina também promoveu aumento no valor da utilização da proteína líquida (NPU). A digestibilidade do concentrado foi baixa (420/o) quando comparada à caseína, mas foi maior que os resultados apresentados por Vieira e Tupinambá (13).

O concentrado de folha de mandioca mostrou ser uma proteína de valor nutricional muito pobre. Esse fato pode ser explicado pela baixa quantidade de metionina. Acreditávamos que o método usado na extração poderia tornar a lisina indisponível devido a reação desse aminoácido com aldeídos, quinonas e polifenóis frequentemente encontrado no extrato da folha. Mas, parece que isso não ocorreu porque quando o concentrado foi acrescido de lisina, não houve melhora na taxa de eficiência proteica (PER).

Os resultados dos exames anátomo patológico dos animais alimentados com o concentrado de folhas e folhas de mandioca não

TABELA 5

ANÁLISE QUÍMICA DAS DIETAS

Análise \ Dietas	Ca-seína	Folha mandioca	Folha + 0.5 metionina	Folha +0.7 lisina	Folha +0.5 met. +0.7 lisina	Concen-trado	Concen. +0.5 metioni-na	Concen. + 0.7 lisina	Concen. +0.5 metionina + 0.7 lisina	Aproteica
Matéria seca	93.2	92.0	92.0	92.0	92.0	92.0	92.0	92.0	93.0	91.0
Estrato etéreo	8.0	9.2	9.0	9.0	9.5	9.3	9.0	8.8	9.1	7.8
Proteína	10.0	10.0	10.2	10.6	9.7	10.9	10.5	10.0	10.0	1.7
Cinzas	4.3	5.7	6.0	6.5	6.0	4.3	4.0	4.9	4.2	3.8
Fibra	—	0.7	0.6	0.6	1.0	0.2	0.2	0.2	0.2	—

TABELA 6

GANHO EM PESO, CONSUMO DE RAÇÃO, CONSUMO DE PROTEINAS, PER, DIGESTIBILIDADE, NPU,
VALOR BIOLÓGICO, PARA CADA UMA DAS DIETAS

Diets	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho ou perda de peso (g)	Consumo ração (g)	Consumo proteico (g)	PER	NPU	Digestibilidade	VB
Folha mandioca	41.5	38.2	-3.35	136.6	13.6	-0.24	4.8	60.2	8.0
Folha + 0.5 metionina	40.9	56.9	16.0	200.0	20.4	0.78	23.9	53.9	44.0
Folha + 0.7 lisina	41.5	24.8	1.36	151.5	16.0	0.08	11.0	40.6	27.0
Folha + 0.5 metionina + 0.7 lisina	39.9	54.3	14.4	165.3	16.05	0.89	23.0	42.0	55.0
Concentrado folhas	39.6	32.4	-7.18	114.0	12.4	-0.57	8.54	48.5	18.0
Concentrado + 0.5 metionina	39.2	47.3	8.05	139.9	14.6	0.55	23.8	37.9	63.0
Concentrado + 0.7 lisina	39.7	35.3	-4.47	102.1	10.5	-0.42	16.0	28.9	55.0
Concentrado + 0.5 metionina + 0.7 lisina	38.3	52.1	13.7	156.7	16.6	0.82	24.5	38.0	64.0
Caseína	38.8	112.9	74.0	250.0	24.9	2.97	67.8	95.5	71.0
Aproteica	44.1	35.0	-9.1	115.5	1.9	-	-	-	-

PER = Protein efficiency ratio.

NPU = Net protein utilization.

Digest. = Digestibilidade.

VB = Valor biológico.

revelou nenhuma alteração em comparação com os órgãos dos animais que receberam a dieta caseína.

Portanto, essa perda de peso dos animais não foi devida à presença de fator tóxico na folha ou no concentrado proteico da folha de mandioca.

Embora, a fortificação com metionina, e metionina mais lisina, aumentasse o valor nutricional da proteína, tanto da folha como do concentrado de folha, esse resultado não foi tão bom quanto os obtidos com os concentrados de *Pereskia* (14). A digestibilidade foi muito baixa comparada com o valor de 50 a 79% reportado para concentrados de outras fontes.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, pelo suporte financeiro concedido para o desempenho desta pesquisa, sem o qual não seria possível sua realização.

SUMMARY

STUDY OF MANIOC LEAF PROTEIN CONCENTRATE. OBTENTION, CHEMICAL ANALYSIS AND AMINO ACID SUPPLEMENTATION

The purpose of this work was to prepare a manioc leaf protein concentrate introducing some new procedures on the known methods developed by other authors.

Chemical composition and biological quality (PER, Digestibility, NPU and BV) of the protein content were measured for diets prepared with leaf protein concentrate and leaf. Histological studies were carried out in some organs.

The protein concentrate and the powdered leaves were supplemented with methionine and lysine, alone and combined.

The protein content (N x 6.25) of the concentrate and the leaf was 34% and 25.2%, respectively.

Addition of either methionine or lysine alone did not improve the growth of the rats. A better response was obtained when both methionine and lysine supplemented the test materials as indicated by the biological criteria, protein efficiency ratio (PER) true digestibility (TD) and biological value (BV).

Histological tests for the organs examined, proved to be normal.

BIBLIOGRAFIA

1. Sgarbieri, V. C. Potencial das proteínas de folhas na alimentação animal e humana. *Bol. SBCTA*, 38: 18-25, 1976.
2. Subba, B. H. Raw & N. Singhi. Studies on nutritive value of leaf protein from Lucerne (*Medicago sativa*). III. Supplementation of rats diets based on wheat. *J. Sci. Food Agric.*, 28: 569, 1971.
3. Woodham, A.A. The world protein shortage: prevention and cure. Em: *World Review of Nutrition and Dietetics*. Geoffrey H. Bourne (Ed.). Vol. 13. Atlanta, Ga, 1971, p. 22.

4. Figueiredo, A. A. & M. Maciel do Rego. Conteúdo de proteínas e minerais em raízes e folhas de mandioca. *Bol. Tec. Cent. Tecnol. Agric. R. J. No. 5*, 23, 1973.
5. **Protein Requirements.** Report of a Joint FAO/WHO Expert Group. Geneva, World Health Organization, 1965.
6. Edwards, R. H., R. H. Miller, D. Fremery, B. E. Knuckles, E. M. Bickoff & G. O. Kohler. Pilot plant productions of an edible white fraction leaf protein concentrate from alfalfa. *J. Agric. Food Chem.*, 23: 620, 1975.
7. Miller, D. S. & A. E. Bender. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. *Br. J. Nutr.*, 9: 382-388, 1955.
8. Parrish, G. K. The prospects of leaf protein as a human food. And a close look at alfalfa. *CRC. Crit. Rev. Food Tech.*, 5(1): 1-13, 1974.
9. Fafunso, M. A. & O. L. Oke. Leaf protein from different cassava varieties. *Nutr. Repts. Internat.*, 14: 629, 1976.
10. Oke, O. L. Leaf protein as solution to protein shortage in developing countries. *J. Nutr. Dietet.*, 6: 37, 1969.
11. Cheeke, P. R., L. Telekm, E. Carlsoon & J. J. Evans. Isolation of cassava leaf protein determination of its nutritive value. *Nutr. Int.*, 19: 249, 1979.
12. Association of Official Agricultural Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC.** 10th ed. Washington, D. C., The Association, 1970, 956 p.
13. Tupinambá, M. L. V. C. & E. C. Vieira. Isolation of cassava leaf protein and determination of its restrictive value. *Nutr. Repts. Internat.*, 19(2): 249-259, 1979.
14. Dayrrel, M. S. & E. C. Vieira. Leaf protein concentrate of the cactacea *Pereskia aculeata* mill. II. Nutritive value. *Nutr. Repts. Internat.*, 15: 539, 1977.