

Avaliação da qualidade nutricional da proteína da folha de mandioca combinada com a caseína pela reação de plasteína¹

Maria do Carmo Gouveia Peluzio, Luiz Carlos Guedes de Miranda, George Henrique Kling de Moraes,
Luciano Esteves Peluzio

Departamento de Nutrição e Saúde. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, MG, Brasil

RESUMO. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de obter um produto protéico e avaliar o seu valor biológico visando o consumo humano e/ou animal. Para isso foram utilizadas folhas de mandioca como matéria prima protéica não convencional. Produziu-se um isolado protéico dessas folhas liofilizado, desengordurado e despigmentado (IPFM). Esse foi misturado à caseína para hidrólise e ressíntese enzimática das proteínas (Reação de plasteína) e, assim, foram obtidos os produtos plasteínas precipitada (PP) e sobrenadante (PS). Os teores protéicos determinados foram de 64,39% na PS, 61,36% na PP e 51,97% no IPFM. Os resultados das determinações da atividade do inibidor de tripsina revelaram um decréscimo de 41% da atividade do inibidor na PP, sugerindo que o tratamento térmico empregado para a inativação da enzima pode ser suficiente para a inativação parcial do inibidor, ou ainda, sugerindo que a diluição com a caseína diminui o inibidor. Foi avaliada a composição aminoacídica dos produtos, mostrando resultados satisfatórios de acordo com os padrões estabelecidos. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram as seguintes conclusões: - A utilização de fontes não convencionais deve ser estimulada, principalmente, quando as proteínas destas fontes não convencionais apresentam-se com um perfil aminoacídico que pode ser utilizado para a complementação do teor de aminoácidos, em alimentos com deficiência em aminoácidos essenciais; - Os produtos protéicos obtidos pela reação da plasteína apresentaram teores satisfatórios de proteína; perfis aminoacídicos compatíveis com as recomendações FAO/OMS/UNU (1985), havendo complementação dos aminoácidos entre as duas fontes utilizadas; - A reação de plasteína pode ainda ser utilizada no processamento de alimentos, caso o processo seja adaptado e controlado em escala industrial. Uma destas utilizações seria, a eliminação de componentes responsáveis pelo sabor amargo e odor estranho de determinados produtos. Uma outra utilização, seria na descoloração de produtos à base de proteína.

Palavras-chave: Plasteína, folha de mandioca, proteína modificada, perfil aminoacídico.

INTRODUÇÃO

Fontes não convencionais de proteínas tanto para rações animais como para consumo humano têm sido estudadas visando obter alimentos de boa qualidade com maior acesso aos consumidores (1).

Uma das alternativas viáveis para obtenção de alimentos

SUMMARY. Nutritional evaluation of protein quality of cassava leaf combined with casein by plastein reaction. The present work was conducted to obtain a proteic product and to evaluate its biological value in order to be used for human and/or domestic animal consumption. Thus, it were used cassava leaves as a non conventional source of protein. It was produced a freeze-dried, fat-free and colourless proteic isolated from those leaves (CLPI). This was mixed with casein and after the mixture as enzymatically hydrolized and re-synthesised (Plastein reaction) to obtain a precipitated (PP) and a soluble plastein (SP) fractions. The protein contents observed were 64.39% (PS), 61.36% (PP) and 51.97% (CLPI). Trypsin inhibitor activities values showed a 41% reduction in the PP fraction suggesting that the heat treatment used to inactivated the enzyme also inactivated partially the inhibitor or the reduction was due to the casein dilution. The aminoacid composition of the frations obtained showed values close to the standards established. It can be concluded: - the utilization of non-conventional source should be stimulated when the proteins from thoses sources have an aminoacidic profile that allow them to be used as an amino acid supplementation in food with low level of essential amino acids; - the fractions obtained by the plastein reaction showed satisfactory protein contents and their amino acid profiles were comparable with the FAO/OMS/UNU (1985) recommendations; - the plastein reaction can be utilized in food processing, after industrial scale adaptation remove compounds responsible to bitter taste, fetidness and to discolour protein products.

Key words: Plastein, cassava leaves, modified protein, aminoacidic profile.

não convencionais é a utilização da reação da plasteína. Esta reação é um método enzimático utilizado para modificação de

1. Parte de tese apresentada ao Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, pelo primeiro autor, como exigência para obtenção do grau de Magister Scientiae em Agroquímica.

proteínas, com o qual se pode corrigir mediante suplementação o teor de aminoácidos limitantes em determinada proteína. Também, pode ser utilizada para melhorar os aspectos organolépticos como aroma e sabor de alimentos, aspectos estes que têm limitado a introdução e aceitação de novos alimentos (2).

A obtenção da plasteína é baseada no processo de alongamento das cadeias peptídicas a partir de hidrolisados parciais de proteína de diferentes origens. Desta forma possibilita a incorporação de aminoácidos esterificados às cadeias protéicas, para posterior síntese de proteínas com melhor valor nutricional denominadas plasteínas. Resumidamente, a metodologia envolve extração e hidrólise enzimática parcial de proteínas de origens diferentes para posterior ressíntese ou alongamento do hidrolisado (3).

Jham et alii (4) observaram que é possível substituir até 6,5% do teor de nitrogênio fornecido pela farinha de soja por um concentrado protéico de folhas de mandioca sem alterar o desempenho de pintos de corte até os 21 dias de idade. Ravindran e Ravindran (5), analisando a composição nutricional da folha de mandioca, notaram variações quando as folhas eram separadas de acordo com o estágio de maturidade. A análise dos teores de aminoácidos revelou que as folhas de mandioca são ricas na maioria dos aminoácidos essenciais, com exceção da metionina e fenilalanina. Após maturação foliar, houve uma tendência de diminuir a concentração destes aminoácidos.

Rosas-Romero e Baratta (6) demonstraram que o concentrado protéico de folha de mandioca reduziu o peso corporal de ratos quando utilizado puro na dieta. Utilizando a reação de plasteína (caseína e proteínas da folha de mandioca) para melhorar a qualidade das proteínas foliares da mandioca, foi observado um aumento no conteúdo de proteína de 47 para 90%, e valores de quociente de eficiência protéica (PER) e quociente de eficiência líquida protéica (NPR) similares aos observados com dieta controle à base de caseína.

Sheen (7), comparando propriedades funcionais e químicas de concentrados protéicos de folhas de alfafa, soja, beterraba e tabaco, verificou haver vantagens no uso de proteínas vegetais na alimentação humana e, ainda, permitindo o total aproveitamento da biomassa vegetal num processo viável economicamente. Nas folhas de alfafa, além do teor adequado de proteínas, encontra-se ainda um resíduo fibroso que auxilia na digestão. A mesma utilização se aplica às folhas de beterraba e soja que, como as folhas de alfafa, são, em geral, utilizadas apenas como adubo orgânico (7).

O presente trabalho utilizou a reação da plasteína para modificar as proteínas da folha da mandioca com caseína para a obtenção de um produto protéico e avaliá-lo nutricionalmente para fins de utilização como insumo alimentar.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do isolado protéico da folha de mandioca

Foram colhidas, aleatoriamente, folhas das plantas nas regiões basal, mediana e apical com pecíolo e, em seguida, acondicionadas em sacos plásticos para transporte. Imediatamente após, em laboratório, as folhas foram lavadas, retirados os pecíolos, limbos foliares picados e colocados em copo de liquidificador com água destilada na proporção de 1:10 (p/v) para trituração por cinco minutos. A parte fibrosa foi separada por coagem em dessorador de *nylon* e descartada. Do volume final obtido do filtrado, foi adicionado 30% de etanol para precipitação das proteínas. Em seguida, o material foi centrifugado por quinze minutos, a 10.240 x g. O precipitado foi separado, congelado e liofilizado. O rendimento de proteína a partir de folhas de mandioca foi de 0,70%.

Para despigmentação e desengorduramento, o precipitado liofilizado foi acondicionado em aparelho de Soxhlet, onde foi submetido a lavagem com acetona/álcool na proporção de 1:1, por oito horas. Após, o material foi triturado em moinho para homogeneização do isolado protéico de folha de mandioca (IPMF) e acondicionado em frasco próprio para posterior hidrólise enzimática.

Hidrólise e ressíntese de proteínas

O IPMF foi misturado com caseína na proporção de 1:1 e dissolvidos em solução tampão fosfato de sódio, pH 7,5, na proporção de 1:10. Em seguida foi adicionado pancreatina a 4% do substrato (8). A hidrólise foi conduzida sob agitação à 37°C, por seis horas e, após, aquecido em banho-maria a 75°C por dez minutos para completa inativação da enzima. Após resfriamento, foi feita centrifugação à 10.240 x g por quinze minutos. O sobrenadante foi congelado e liofilizado para posterior utilização no processo de ressíntese. O precipitado foi descartado.

O material sobrenadante liofilizado foi dissolvido em solução a 40% (p/v em relação ao hidrolisado) de tampão fosfato de sódio, pH 5,5. Em seguida, foi adicionado 2% de pancreatina (p/v em relação ao substrato). A mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente sem agitação por 24 horas. Após este período, a mistura protéica foi precipitada com solução hidroalcoólica a 30% e, em seguida, centrifugada por quinze minutos a 10.240 x g.

O sobrenadante e o precipitado, foram congelados e liofilizados, obtendo-se assim a plasteína precipitada (PP) e a plasteína sobrenadante (PS) de acordo com metodologia descrita por Yamashita et alii (9).

Determinação dos teores de proteína

Foram determinados os teores protéicos do IPMF, PP e PS pelo método semi-micro de Kjeldahl, com três repetições, conforme metodologia descrita no A.O.A.C. (10).

Dosagem de inibidor de tripsina

Foram determinadas as atividades dos inibidores de tripsina no IPMF e nas frações PP e PS pelo método de Kakade et alii (11).

Análise de aminoácidos

Os aminoácidos foram dosados em analisador automático de aminoácidos, Perkin-Elmer, Mod. 034, a partir dos hidrolisados obtidos por hidrólise ácida, segundo técnica recomendada por Spackman et alii (12).

Determinação de triptofano

Foram determinados os teores de triptofano no IPMF, PP e PS utilizando-se o método de Villegas & Mertz (13).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores protéicos observados no IPMF, PP, PS e caseína e os resultados da atividade de inibidor de tripsina estão na Tabela 1.

TABELA 1

Teores protéicos e atividades de inibidor de tripsina (TUI)

	Caseína	IPFM ¹	PP ²	PS ³
Teor protéico (%)	76,05	51,97	61,36	64,39
TUI ⁴	—	93,70	55,30	86,10

1. Isolado protéico da folha de mandioca
2. Plasteína precipitada
3. Plasteína sobrenadante.
4. Unidade de inibidor de tripsina

A avaliação do IPMF obtida no presente trabalho pela análise química mostrou um rendimento protéico de 51,97%, resultado comparável aos obtidos por Chaves (14). As folhas e a parte superior da planta (folhas + talo) apresentaram conteúdo protéico significativamente mais alto que o caule (14).

A aplicação da reação da plasteína no IPMF combinado com caseína, resultou em uma PS com 64,39% de proteína e uma PP com 61,36% de proteína. Estes resultados não são totalmente concordantes com os obtidos por Miranda et alii (15) que ao trabalharem com isolado protéico de soja e caseína utilizando, também, pancreatina como enzima hidrolítica e de ressíntese, obtiveram maior rendimento na PP (71,17%) e menor na PS (63,70%). O isolado obtido com folha de mandioca apresentou menor capacidade de ressolubilização e, portanto, ficou com teor protéico mais alto na PS pela predominância de pequenos peptídeos não combinados. Estes resultados concordam com os de Forato (16), que também obteve maior rendimento protéico para PS do que para PP.

Os resultados da atividade do inibidor de tripsina foram reduzidos após a reação de plasteína em 41,0% na PP em relação ao IPMF. Por outro lado, na PS, a redução da atividade do mesmo inibidor foi de apenas 8%. Rosas-Romero (6), comparando a composição do concentrado protéico da folha da mandioca e de uma plasteína obtida destas mesmas folhas, observou após a reação da plasteína, um aumento de 90% na

concentração da proteína, redução significativa no conteúdo de tanino, completa eliminação do HCN e diminuição na atividade do inibidor de tripsina, ficando essa atividade em nível de detecção bem abaixo do máximo aceitável em proteínas originárias de folhas.

A Tabela 2 mostra a composição aminoacídica do IPMF, PP e PS, bem como da proteína padrão caseína.

TABELA 2

Composição aminoacídica (mg %) da caseína, isolado protéico da folha de mandioca (IPMF), plasteína precipitada (PP) e plasteína sobrenadante (PS)

Aminoácidos	Caseína	IPMF	PP	PS
Arginina	—	3,57	2,45	2,52
Lisina	6,99	3,10	3,98	3,30
Histidina	2,46	1,14	1,22	1,30
Acido glutâmico	18,87	5,62	10,21	9,35
Acido aspártico	6,16	5,10	3,94	4,10
Fenilalanina	4,50	3,10	2,23	2,97
Tirosina	4,95	2,44	1,80	7,56
Triptofano	1,00 ¹	0,04	0,31	0,43
Treonina	3,67	2,51	2,21	2,25
Serina	5,10	2,54	3,73	2,99
Alanina	2,61	3,15	1,72	1,96
Valina	5,67	3,96	4,02	4,10
Leucina	8,13	5,02	4,54	4,77
Isoleucina	4,30	2,42	2,42	2,51
Metionina	2,28	1,35	1,23	1,51
Prolina	9,55	3,14	5,23	4,45
Glicina	1,59	2,83	1,13	1,51

1. Valor obtido por Sgarbieri, (21)

Os resultados obtidos são comparáveis, com pequenas variações, aos encontrados por Miranda et alii (17), quando utilizaram hidrolisados enzimáticos de proteína de soja e caseína, para determinar o perfil aminoacídico destes hidrolisados. A partir dos hidrolisados obtidos prepararam plasteínas e verificaram a interação entre os hidrolisados através do acompanhamento do perfil em aminoácidos das plasteínas obtidas em relação aos hidrolisados de origem. Concluíram que as misturas de hidrolisados para obtenção de plasteínas devem ser calculadas de acordo com a constituição aminoacídica desejada para o produto.

No presente estudo foi utilizado uma mistura na proporção de 50/50 (caseína + IPMF) e evidenciamos um resultado em que o perfil aminoacídico das plasteínas se apresenta bem superior em quase todos os aminoácidos essenciais ao isolado protéico da folha da mandioca. Grande melhoria pode ser notada principalmente no valor do ácido glutâmico, com 60% de aumento em relação ao isolado, e na tirosina, obtendo-se um valor superior ao padrão caseína.

Na hidrólise de substratos comumente usados em formulações nutricionais, especialmente caseína, uma mistura

de exo e endopeptidases é frequentemente usado. Em geral, enzimas purificadas não provêm um perfil de peso molecular que é compatível com formulações, sem o uso de ultrafiltração. Soluções enzimáticas puras são limitadas em sua capacidade de hidrólise (18). Portanto, apesar da melhoria do perfil aminoacídico em grande parte dos aminiácidos, talvez esta seja a explicação para as diferenças nas misturas de PP e PS, em alguns casos inferiores a IPMF.

É sabido que as proteínas das folhas e da parte aérea da mandioca apresentam boa qualidade, ou seja, um bom perfil aminoacídico, com deficiência apenas de alguns sulfurados, principalmente de metionina mas com teores elevados de lisina.

Yeoh e Chew; Montaldo citados por Carvalho e Kato (1), compararam a composição em aminoácidos das folhas e da parte aérea da mandioca, capim elefante, capim guiné e soja, e registraram a superioridade da folha da mandioca com relação á maioria dos aminoácidos essenciais. O teor relativamente alto de lisina na folha de mandioca, possibilitou a formulação de dieta, nas quais a parte aérea da folha entra como suplementadora de aminoácidos dos cereais, visando á obtenção de melhor qualidade protéica.

O conteúdo de aminoácidos essenciais da alimentação deve seguir o padrão sugerido pelo INFORME FAO/OMS/UNU (19) que foi baseado nas necessidades de aminoácidos essenciais para crianças pré-escolares, devendo ser utilizado para avaliar também os outros grupos, excetuando-se crianças de menos de um ano de idade (20).

Na Tabela 3 foi comparado o perfil aminoacídico do isolado protéico da folha da mandioca e das plasteínas, com as recomendações em composição aminoacídica para lactente, pré-escolar, escolar e adulto (20).

TABELA 3

Comparação de distribuições recomendadas das necessidades de aminoácidos segundo a faixa etária com a composição de aminoácidos do isolado protéico da folha de mandioca (IPFM) e das plasteínas precipitada (PP) e do sobrenadante (PS)

Aminoácidos	Necessidades recomendadas (mg/g)*				Valores observados (mg/g)		
	Lactente	Pré-escolar	Escolar	Adulto	IPFM	PS	PP
Histidina	26	19	19	16	22	19	21
Isoleucina	46	28	28	13	47	38	41
Leucina	93	66	44	19	97	70	78
Lisina	66	58	44	16	60	62	63
Metionina + Cisteína	42	25	22	17	26	19	25
Fenilalanina + Tirosina	72	63	22	19	60	35	48
Treonina	43	34	28	9	48	34	37
Triptofano	17	11	9	5	0,86	7	5
Valina	55	35	25	13	76	62	67

* Referência (19)

Observa-se que o perfil aminoacídico varia muito de acordo com a faixa etária, e que apesar do resultado indicar um

percentual maior de proteína na plasteína sobrenadante (64,39%); a plasteína precipitada com menor percentual protéico (61,36%) apresentou um perfil aminoacídico mais adequado á comparação, porém, o isolado protéico da folha da mandioca apresenta ainda melhor em composição de aminoácidos essenciais, em relação ás plasteínas. Talvez este resultado venha comprovar a necessidade de se obter uma melhor solubilização e, conseqüentemente, melhor aproveitamento do isolado protéico, mostrando-se necessário uma purificação mais sofisticada da proteína isolada.

Para as diferentes fases da vida as quantidades recomendadas são variáveis, e o perfil aminoacídico de referência é encontrado nas proteínas de boa qualidade, geralmente de origem animal. Entretanto, misturas de proteínas vegetais, muitas vezes atingem padrões aminoacídicos aceitáveis. Como é o caso das proteínas analisadas no presente estudo, que á exceção da metionina e fenilalanina, que continuaram como aminoácido limitante para o lactente e pré-escolares, todos os outros aminoácidos estão compatíveis com as recomendações, tanto no isolado protéico quanto nas plasteínas.

REFERÊNCIAS

- Carvalho VD & Kato MSA. Potencial de utilização da parte aérea da mandioca. Informe Agropecuário, 1987;145: 23-7.
- Baldini VLS, Campos SDS, Srebernich SM. Sabor dos alimentos: os problemas e sua modificação. Campinas, Boletim do ITAL, 1983; 20: 249-60.
- Eriksen S & Fagerson IS. The plastein reaction and its applications: A review. J Food Sci, 1976;41: 490-3.
- Jham GN, Morales GHK & Campos LG. Preliminary nutritional evaluation of cassava leaf protein concentrate in young chicks. Arq Biol Technol, 1989;32: 703-8.
- Ravindran G & Ravindran V. Changes in the nutritional composition of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) beaves during maturity. Food Chemistry, 1988;27: 299-309.
- Rosas-Romero A & Baratta C. Composition, functional properties, and biological evaluation of a plastein from cassava leaf protein. Plant Foods for Human Nutrition, 1987;37: 85-96.
- Sheen SJ. Comparison of chemical and functional properties of soluble leaf proteins from four plant species. J Agric Food Chem, 1991;39: 681-5.
- Fukushima D. Effect of physical and chemical processing factors on the redispersibility or dried soy milk proteins. Cereal Chem, 1970;47: 571-9.
- Yamashita M, Arai S, Matsuyama J, Gonda M, Kato H & Fujimaki M. Enzymatic modification of proteins in foodstuffs. Part III. Phenomenal survey on α - chymotryptic plastein synthesis from peptic hydrolyzate of soy protein. Agr Biol Chem, 1970; 34: 1484-91.
- AOAC. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists. Horwitz W. (ed), 40 th. Washington, D.C., 1984; 1141p.
- Kakade ML, Simons N & Liener IE. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the anti-triptic activity of soybean samples. Cereal Chem, 1969; 46: 518-27.
- Spackman DH, Stain WH & Moore S. Automatic recording

- apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analyt Chem*, 1958;30: 1190-206.
13. Villegas E, Mertz ET. Chemical screening methods for maize protein quality arcymmit. *International Maize and Wheat Improvement Center Ras, Bull.* 1971.
 14. Chavez JG. Extrato protéico das folhas de mandioca. *Informe agropecuário*, 1987;145:47-52.
 15. Miranda LCG, Mendonça RCS & Albuquerque TTO. Síntese de plasteínas: caracterização de algumas propriedades nutricionais. *Revista Ceres*, 1991;38: 277-85.
 16. Forato ALSC. Caracterização Nutricional da Plasteína Obtida da Proteína da Soja e das Proteínas do Soro de Queijo. Viçosa, M.G., UFV, 1994; 52 p. (Tese M.S.)
 17. Miranda LCG, Albuquerque TTO & Mendonça RCS. Composição aminoacídica de hidrolisados de proteína de soja, caseína e de plasteínas de soja e caseína. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 15a, Caxambú, 1992. Anais... Caxambú, MG, SBQ, 1992. n.p.(suplemento 2)
 18. Martins MTS, Galeazzi MAM. Alergia alimentar: considerações sobre o uso de proteínas modificadas enzimaticamente. *Cadernos de debate*, 1996;4: 89-110.
 19. Informe de una reunión consultiva conjunta FAO/OMS/ONU de expertos. *Necesidades de energia y de proteínas*, Ginebra, 1985; 220 p.
 20. Vannuchi H, Menezes EW, Campana HO & Lajolo FM. Aplicações das recomendações nutricionais adaptadas à população brasileira. *Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, Editora Legis Suma Ltda, Ribeirão Preto, SP, 1990, 156p.
 21. Sgarbieri VC. Alimentação e Nutrição: fator de saúde e desenvolvimento. *Campinas*, Editora da Unicamp, São Paulo, 1987, 387p.

Recibido: 02-07-1997

Aceptado: 18-08-1998