OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CONCENTRADO PROTÉICO DE AGUAPÉ (*Eichhornia crassipes*)

HELENA CARRASCOSA VON GLEHN STRANO

Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Profa. Dra. MARÍLIA OETTERER DE ANDRADE

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro de 1987

S897o

Strano, Helena Carrascosa Von Glehn

Obtenção e caracterização de concentrado proteico de aguapé (Eichhornia crassipes). Piracicaba, 1987.

128p.

Diss.(Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Aguapé - Concentração de nutriente 2. Proteína de aguapé 3. Resíduo vegetal - Uso I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD - 641.12

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CONCENTRADO PROTÉICO DE AGUAPÉ
(*Eichhornia crassipes*)

HELENA CARRASCOSA VON GLEHN STRANO

Aprovada em: 16/12/87

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Paulo Roberto Cantarelli	ESALQ/USP
Profa. Dra. Marília Oetterer de Andrade	ESALQ/USP
Profa. Dra. Sílvia Maria F. Cozzolino	FCF/USP

Marília Oetterer de Andrade
Orientadora

À amiga e orientadora Dra.

*Marília Oetterer de Andrade
agradeço o apoio, a dis-
ponibilidade e a con
fiança.*

À filha e companheira Paula
DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

- Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos e pelo financiamento deste projeto.
- Ao Dr. Urgel de Almeida Lima pela orientação e pela disponibilidade das instalações do Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ.
- Ao CENA, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pelo fornecimento das plantas de aguapé.
- À Ivani Marchetto Moreno pela colaboração nas análises.
- Aos Professores e funcionários do Departamento de Tecnologia Rural, pela ajuda e sugestões.
- Aos pesquisadores da Secção de Radioquímica e Química Analítica do CENA-USP, em especial ao Prof Krug, pela dosagem dos elementos minerais.
- À Dra. Silvia M. Cozzolino, do Setor de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela orientação na avaliação nutricional.
- Ao Dr. Alfredo Tenuta Filho, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelas sugestões para a determinação das propriedades funcionais.
- Ao ITAL, Instituto de Tecnologia de Alimentos, pela dosagem de aminoácidos.

À colega Suzana Oellers Ferreira pela revisão e sugestões.

Ao colega Antonio Carlos Ramos Gonçalves, Madeira, pela sugestão inicial.

Ao Amadeu A. Queiroz pela ilustração.

À Rita Bueno pela ajuda na retomada deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xi
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. As proteínas de folhas.....	6
2.2. O aguapê como matéria prima para a obtenção de concentrados protéicos de folhas.....	11
2.3. Extração das proteínas e preparação dos concen trados protéicos de folhas.....	19
2.3.1. Extração das proteínas.....	19
2.3.2. Produção de concentrados integrais.....	26
2.3.3. Produção de concentrados despigmentados	31
2.3.3.1. Concentrados integrais despig- mentados.....	32
2.3.3.2. Concentrados "brancos" ou cito plasmáticos.....	34
2.4. Valor nutricional dos concentrados protéicos de folhas	43
2.4.1. Composição química	43
2.4.2. Qualidade da proteína	45
2.4.3. Fatores que afetam a qualidade nutricio nal dos concentrados protéicos de fo- lhas.....	53
2.4.4. Os concentrados protéicos de folhas na alimentação animal e humana.....	58

2.5. Propriedades funcionais de concentrados proteícos de folhas.....	61
2.5.1. Solubilidade	63
2.5.2. Capacidade de absorção de água e óleo..	65
2.5.3. Capacidade de formar emulsões.....	67
2.5.4. Capacidade de formar gel.....	69
2.5.5. Capacidade de formar espuma	70
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
3.1. Materiais.....	72
3.1.1. Matéria-prima.....	72
3.1.2. Concentrado protéico de aguapé.....	72
3.1.3. Animais.....	72
3.1.4. Rações.....	73
3.1.5. Gaiolas	73
3.2. Métodos	74
3.2.1. Preparação do concentrado protéico.....	74
3.2.1.1. Metodologia básica de obtenção	74
3.2.1.1.1. Lavagem e separação de raízes.....	74
3.2.1.1.2. Desintegração.....	74
3.2.1.1.3. Extração das proteínas.....	74
3.2.1.1.4. Centrifugação.....	74
3.2.1.1.5. Precipitação das proteínas do suco..	75
3.2.1.1.6. Separação do precipitado.....	75
3.2.1.1.7. Secagem.....	75
3.2.1.2. Determinação dos parâmetros mais adequados de processamento.....	75

	Página
3.2.1.2.1. Experimento 1.....	75
3.2.1.2.2. Experimento 2.....	77
3.2.1.2.3. Experimento 3.....	79
3.2.1.2.4. Processamento final	81
3.2.1.2.5. Redução do teor de cinza do concentra- do seco.....	81
3.2.2. Análises químicas.....	82
3.2.2.1. Umidade.....	83
3.2.2.2. Proteína bruta.....	83
3.2.2.3. Proteína verdadeira.....	83
3.2.2.4. Lipídeos.....	83
3.2.2.5. Cinza	83
3.2.2.6. Elementos minerais.....	83
3.2.2.7. Teor de aminoácidos.....	84
3.2.2.8. Cômputo químico.....	85
3.2.3. Avaliação biológica.....	85
3.2.3.1. Ração.....	85
3.2.3.2. Proteína.....	86
3.2.4. Propriedades funcionais.....	87
3.2.4.1. Solubilidade.....	87
3.2.4.2. Dispersibilidade.....	88
3.2.4.3. Absorção de água.....	88
3.2.4.4. Absorção de óleo.....	89
4. RESULTADOS.....	90
4.1. Matéria-prima.....	90
4.1.1. Composição química.....	90
4.2. Parâmetros mais adequados de processamento....	90
4.2.1. Experimento 1.....	90
4.2.2. Experimento 2	91
4.2.3. Experimento 3	92

	Página
4.2.4. Processamento final	93
4.2.5. Rendimento.....	94
4.2.6. Determinação da redução do teor de cin za	95
4.3. Concentrado protéico de aguapê (CPA).....	96
4.3.1. Composição química.....	96
4.3.2. Elementos minerais.....	96
4.3.3. Aminoácidos do CPA e cômputo químico..	97
4.3.4. Avaliação biológica.....	99
4.3.4.1. Coeficiente de Eficácia Ali - mentar e Coeficiente de Eficá cia Protéica (CEP).....	99
4.3.4.2. Coeficiente de Digestibilidade	99
4.3.4.3. Razão Protéica Líquida (RPL).	100
4.3.5. Propriedades funcionais.....	100
4.3.5.1. Solubilidade.....	100
4.3.5.2. Dispersibilidade.....	101
4.3.5.3. Absorção de água.....	101
4.3.5.4. Absorção de óleo.....	101
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	102
5.1. Matéria-prima.....	102
5.2. Parâmetros mais adequados de processamento...	102
5.3. Concentrado protéico de aguapê.....	107
5.4. Propriedades funcionais do CPA	112
6. CONCLUSÕES.....	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CONCENTRADO PROTÉICO DE AGUAPÉ

(*Eichhornia crassipes*)

Autora: HELENA CARRASCOSA VON GLEHN STRANO

Orientadora: Profa. Dra. MARÍLIA OETTERER DE ANDRADE

RESUMO

Visando criar uma alternativa para o aproveitamento da grande quantidade de biomassa de aguapé produzida, seja nos programas de despoluição, seja em reservatórios de usinas hidrelétricas, foi produzido em laboratório e caracterizado um concentrado protéico.

Foi testada a eficiência de diferentes agentes na extração e precipitação das proteínas, foi avaliado o rendimento do processo e foram discutidas alterações a serem introduzidas a fim de melhorar o rendimento e a qualidade do produto. O concentrado obtido foi avaliado quanto à qualidade nutricional, pela análise da composição química e dos aminoácidos e pela avaliação biológica e quanto à qualidade tecnológica pela determinação das propriedades funcionais.

Os melhores resultados no processamento, foram conseguidos através de lavagem, corte, separação e descarte das raízes; desintegração em moinho de martelos; extra

ção das proteínas pela ação de três partes de NaOH 0,05N para uma parte de material desintegrado; centrifugação e descarte da porção fibrosa; precipitação isoelétrica das proteínas a pH 3,5, pela adição de HCl; separação do precipitado por decantação e secagem do material protéico obtido sob circulação de ar.

Através do procedimento descrito conseguiu-se extração de 46,48% da proteína original do aguapé e recuperação no concentrado de 48,48% da proteína extraída, ou seja, 22,53% da proteína original.

O concentrado obtido conforme descrito apresentou a seguinte composição na matéria seca: Proteína bruta; 35,39%; Proteína verdadeira; 31,71%; Lipídeos: 2,49%; Cinza: 33,61% e Carboidratos: 22,95%; além de teor de umidade igual a 5,56%. Não se detectou a presença de metais pesados em níveis superiores aos limites máximos de tolerância para a legislação brasileira.

ciais estão presentes no concentrado e que seu valor nutricional é limitado pelo teor de lisina (cômputo químico = 51,99 em relação à caseína e 78,36 em relação à proteína padrão da FAO). Acredita-se que a deficiência em lisina seja devida principalmente à degradação da mesma pelo calor durante a secagem e à ocorrência de reação de Maillard durante a etapa de extração sob condição fortemente alcalina.

Na avaliação biológica não se obteve resultados satisfatórios: os animais que receberam concentrado de aguapé como única fonte protéica na ração perderam peso em relação ao peso inicial. A digestibilidade encontrada foi de 53,36% para o concentrado protéico de aguapé e de 92,00% para a caseína, e a razão protéica líquida, RPL, ou "net protein ratio", NPR foi de 0,40 para o concentrado de aguapé e 4,30 para a caseína. O consumo da ração contendo concentrado de aguapé foi muito baixo, acredita-se que em função do alto teor de cinza presente.

O concentrado de aguapé mostrou-se com baixa solubilidade e dispersibilidade, provavelmente devido à interferência do alto teor de cinza e às reações de oxidação e de escurecimento não enzimico. A capacidade de absorção de água e óleo observada é comparável à de outros concentrados de folhas. Como a utilização dos concentrados de folhas como aditivos na alimentação humana é limitada pela influência do "flavor" e da cor, considera-se que a conveniência do estudo mais detalhado das propriedades funcionais esteja vinculada à produção de concentrados em que estes problemas tenham sido eliminados ou minimizados.

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF WATER HYACINTH (*Eichhornia crassipes*) PROTEIN CONCENTRATE

Author: HELENA CARRASCOSA VON GLEHN STRANO

Adviser: Profa. Dra. MARÍLIA OETTERER DE ANDRADE

SUMMARY

In search of alternatives for the use of biomass produced in great quantities in despollution programas or in plant reservoirs, a water hyacinth proteic concentrate was produced and characterized.

The efficiency of different agents in the protein extraction and purification and in the yield of the process were evaluated.

The nutritional value of the concentrate was evaluated by the analysis of it's aminoacids and chemical composition and biological tests. The technological quality of the concentrate was determined by its funcional properties.

Whithin the variable tested, best results were obtained through washing, cutting, separating, discarding roots and desintegrating the matter in a mill. Protein extraction was executed through the action of 3 parts of 0,05N NaOH and 1 part of desintegrated material; centrifugation and

elimination of fibrous portion; protein isoelectric precipitation at pH 3,5 with the addition of HCl; separation at the precipitate through decantation and drying of the matter under forced air circulation.

Through the described process 46.46% of water hyacinth total protein was extracted and 48.48% of the extracted protein or 22,53% of the total protein was recovered in the concentrate.

The protein concentrate composition was in percent of dry matter: total protein: 35.39%; true protein: 31.71%; lipides: 2.49%; Ash: 33.61%; carbohydrates: 22.9%. Water content of the concentrate was 5.56%. Heavy metals levels were not detected above the levels allowed by Brazilian laws.

All essential aminoacids were present in the concentrate and its nutritional value is limited by lysine levels (chemical score=51.99 in relation to casein and 78.36 in relation to FAO standard protein).

The digestibility was of 53.36% for the protein concentrated and of 92.00% for casein. The net protein ratio NPR - was of 0.40 for the protein concentrate and 4.30 for casein. The diet, containing water hyacinth protein, was consumed in very low quantities possibility due to its high ash content.

High ash content and oxidation and nonenzimatic

darkening reactions interfered on low solubility and dispersibility of the water hyacinth protein concentrate; water and oil absorption capacity is comparable to other leaf concentrates.

Alterations in the procedure of extraction and purification to enhance the product yield and quality were discussed.

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que grande parte da população mundial sofre de desnutrição, em especial a carência protéica. Sabe-se também que esta situação deve-se mais à má distribuição dos suprimentos protéicos existentes do que à falta de proteínas.

As grandes diferenças sócio-econômicas existentes entre as várias regiões do mundo levam a uma situação em que a população dos países mais desenvolvidos, que representa cerca de 25% da humanidade, consome de 90 a 100g de proteínas por habitante por dia, mais da metade de origem animal, enquanto que para 50% da população mundial, somente estão disponíveis diariamente cerca de 50g de proteínas por habitante, a maior parte de origem vegetal. Por outro lado, se 80% das proteínas vegetais produzidas atualmente na forma de grãos fossem usadas diretamente na alimentação humana, e se fossem equitativamente distribuídas, seriam suficientes para fornecer 90g de proteínas por habitante diariamente, mas o que se observa é que mais da metade destas proteínas é usada na alimentação animal. Se forem consideradas também as proteínas consumidas por estes na forma de forrageiras, observa-se um rendimento da conversão de proteína vegetal em proteína animal de aproxima

damente 12%. Como se vê, grandes quantidades de proteínas vegetais, que seriam suficientes para alimentar toda a população mundial, transformam-se em quantidades muito menores de proteínas animais, que só serão consumidas por pequena parte da humanidade (FAUCONNEAU, 1983).

Para agravar a situação, estima-se que as necessidades protéicas mundiais dobrarão até o final deste século e que a produção de alimentos convencionais não acompanhará a demanda alimentar. Este fato tem sido um estímulo para a busca de novas fontes de alimentos, que têm sido desenvolvidos a partir de produtos até então não utilizados e, em paralelo, têm sido propostas formas alternativas de aproveitamento das fontes usuais de proteínas (SGARBIERI, 1976).

Como não se pode esperar, a curto prazo, uma reversão da situação mundial que leve a uma distribuição mais equitativa dos suprimentos protéicos existentes, deve-se buscar alternativas para minimizar os problemas observados.

Um aumento na disponibilidade de proteínas vegetais poderia ser conseguido pelo aumento da produção total de alimentos de origem vegetal, através do melhoramento genético da qualidade das proteínas obtidas e pelo uso mais racional das proteínas atualmente disponíveis (FIORENTINI & GALOPPINI, 1983).

Com relação ao terceiro ponto mencionado, deve-se considerar, em especial, as possibilidades de utilização das proteínas de folhas, seja diretamente na alimentação humana,

seja na alimentação de animais monogástricos, com a conseqüente liberação para o consumo humano das grandes quantidades de proteínas de grãos atualmente consumidas por estes animais.

Apesar das folhas representarem o maior suprimento mundial de proteínas, sendo a fotossíntese a única fonte renovável e não dilapidável de alimento e de energia para o mundo, as folhas verdes são usadas basicamente na alimentação de ruminantes. Segundo PARRISH *et alii* (1974), somente 1% das plantas comestíveis é usado rotineiramente como alimento; 95% de nossa alimentação provêm de apenas 20 espécies e, em muitos países, apenas 6 espécies são exploradas atualmente.

Quanto à qualidade das proteínas de folhas, observa-se que, embora os teores protéicos sejam variáveis, a análise destas proteínas revela uma composição de aminoácidos bastante semelhante entre as diferentes espécies vegetais. Segundo AKESON & STAHMANN (1965), as proteínas e os concentrados de folhas contêm mais lisina que o cereal mais rico neste aminoácido, mais metionina que a soja e podem ser comparados favoravelmente com proteínas de origem animal.

A relação proteína/fibra da maioria das plantas e a indigestibilidade das paredes celulares, pelo seu teor de celulose, são as razões que limitam o consumo direto de proteínas de folhas pelo homem e por animais monogástricos. A produção de concentrados protéicos de folhas é uma maneira de tornar estas proteínas diretamente utilizáveis.

Várias espécies vegetais têm sido usadas na preparação de concentrados protéicos de folhas; as leguminosas têm sido as principais fornecedoras de matéria-prima, e dentre elas, a alfafa vem sendo a mais estudada por sua alta produtividade e boa qualidade protéica. Muito importante também, é a possibilidade de utilização de resíduos vegetais, como folhas de cenoura, beterraba, feijão e batata.

O aguapé (*Eichhornia crassipes*) é uma planta que entre outras características, apresenta uma produtividade muito alta, podendo atingir 360 a 480 t/ha . ano (WOLVERTON & McDONALD, 1979), o que faz com que seja considerado uma importante praga aquática, causando problemas em rios, reservatórios de usinas hidrelétricas e reservatórios de água para irrigação. O aguapé tem a capacidade de incorporar em seus tecidos altas quantidades de nutrientes (KNIPLING et alii, 1970), o que torna interessante sua utilização como agente despoluidor de águas.

A produção de grandes quantidades de biomassa de aguapé durante o processo de despoluição de água, e alta produtividade desta planta em espelhos d'água e em reservatórios de usinas hidrelétricas, conferem-lhe um custo de produção nulo que, aliado à boa composição química observada (WOLVERTON & McDONALD, 1979), tornam interessante o seu aproveitamento como matéria-prima para a produção de concentrados protéicos de folhas.

Visando obter um concentrado protéico de aguapé,

buscou-se estabelecer os parâmetros tecnológicos para sua produção, bem como avaliou-se algumas características nutricionais e propriedades funcionais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PROTEÍNAS DE FOLHAS

A morfologia e a bioquímica das folhas têm sido bastante estudadas por causa da grande importância da fotossíntese. Tanto a fotossíntese, como a biossíntese de proteínas, carboidratos e lipídeos, são realizadas nas células do mesófilo.

Nas células do mesófilo juntamente com o núcleo estão presentes muitos cloroplastos (mais de 100 por célula) e milhares de organelas muito pequenas, como as mitocôndrias. Todas essas organelas estão embebidas em um gel protéico, o citoplasma, que circunda um vacúolo central. Este vacúolo, que se apresenta cheio de água, ocupa 60 a 80% do volume total da célula. O citoplasma, com suas organelas, contém cerca de 95% das proteínas e somente 20% da água total da célula. A membrana externa ao citoplasma mantém a turgidez da célula; essa turgidez pode ser perdida pelo aquecimento do tecido a 60 - 80°C, o que desnatura e insolubiliza as proteínas, fixando-as no interior da célula. Por esta razão, o suco que é liberado de células aquecidas é composto quase que só pelo conteúdo dos vacúolos (KOHLEK & LYON, 1977).

A composição química das folhas, ao contrário do que ocorre com as sementes, é relativamente uniforme, especialmente no que se refere à fração protéica, que representa em média de 10 a 20% da matéria seca.

Segundo FIORENTINI & GALOPPINI (1983), cerca de três quartos das proteínas da parte aérea das plantas verdes estão concentradas nas células do mesófilo. Aproximadamente 80% dessas proteínas estão concentradas nos cloroplastos, onde podem ser divididas equitativamente entre a fase solúvel e o sistema de membranas lamelares. A maior parte dos 20% restantes formam o gel citoplasmático e uma pequena parte está no núcleo (1 a 2%) e nas mitocôndrias (menos de 5%).

As proteínas das plantas podem ser classificadas de diferentes maneiras, como por exemplo de acordo com sua ocorrência e localização, ou de acordo com sua atividade metabólica, entre outros critérios. Mas, a classificação baseada na solubilidade, desenvolvida por Osborne, é mais apropriada às proteínas vegetais (DANIELSON, 1956).

Com base na solubilidade em água, as proteínas de folhas podem ser divididas aproximadamente em partes iguais entre solúveis e insolúveis. A fração insolúvel consiste principalmente de proteínas lamelares dos cloroplastos associadas à clorofila, carotenóides e pequenas quantidades de elementos inorgânicos, formando complexos em que a proteína é responsável apenas pela metade do peso total (BONNER & GALSTON, 1967).

Uma proteína conhecida como "fração I" é responsável por cerca da metade da fração solúvel. Essa proteína está localizada no estroma, onde exerce atividade enzimica essencial na fixação de CO_2 durante a fotossíntese. A proteína "fração I", embora tenha origem nos cloroplastos, não está associada a pigmentos e lipídeos. Ela tem sido repetidamente isolada de extratos de folhas de diversas plantas, e no caso do fumo, foi isolada na forma cristalina por diversos pesquisadores, entre eles KUNG (1976) e KUNG *et alii* (1980). Atualmente, existe muita informação disponível sobre esta proteína, também denominada ribulose difosfato carboxilase; sabe-se que está presente em grandes quantidades em todos os tecidos fotossintetizantes e é uma das proteínas mais abundantes que existe. No material nitrogenado restante existem aminoácidos livres e oligopeptídeos em grande quantidade, refletindo a alta atividade de síntese protéica que ocorre no mesófilo (FIORENTINI & GALOPPINI, 1983).

Vários pesquisadores analisaram o perfil de aminoácidos das proteínas de folhas, e conforme pode ser esperado, devido a presença das enzimas responsáveis pela fotossíntese e por outras atividades comuns às folhas, a composição das proteínas em aminoácidos é bastante semelhante, tendo sido observadas variações muito pequenas entre espécies, entre diferentes condições de cultivo e entre plantas de diferentes idades (BONDI, 1958; CHIBNALL *et alii*, 1963; GERLOFF *et alii*, 1965; BONNER & GALSTON, 1967; BYERS, 1971). Os dados apresentados na Tabela 1 ilustram o que foi afirmado.

Tabela 1. Aminoácidos de proteínas de folhas de diferentes espécies vegetais.

Aminoácido (%)	<i>Phalaris tuberosa</i>	<i>Hordium murinum</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Medicago denticulata</i>	<i>Spinacea oleracea</i>	<i>Brassica oleracea</i>	<i>Lolium perenne</i>
Ac. Aspartico	6,34	6,12	6,46	6,74	6,98	6,50	5,85
Ac. Glutâmico	7,15	6,84	7,25	7,23	6,75	6,80	7,06
Serina	4,43	4,54	4,50	5,01	4,18	4,95	4,21
Treonina	4,18	4,00	4,39	4,39	4,24	3,76	3,64
Prolina	4,14	3,95	3,77	3,96	3,93	3,80	3,90
Glicina	7,05	7,11	6,57	6,46	5,47	5,90	6,56
Alanina	7,01	6,54	6,17	6,53	7,11	5,70	6,56
Valina	5,33	4,65	4,87	5,06	4,84	5,00	4,82
Cistina	1,39	1,34	1,17	1,27	1,39	1,86	1,65
Metionina	1,57	1,42	1,36	1,32	1,30	1,33	1,60
Isoleucina	3,62	3,34	3,49	3,47	3,62	3,68	3,49
Leucina	6,52	6,13	6,66	6,53	6,67	6,08	6,52
Tirosina	2,08	2,31	2,30	2,42	2,70	2,20	2,26
Fenilalanina	3,52	3,16	2,28	3,28	3,62	2,93	3,23
Lisina	9,16	8,71	8,61	9,22	9,64	9,74	8,96
Histidina	3,95	3,87	4,07	4,34	4,74	4,20	4,15
Arginina	13,62	12,89	12,95	12,46	13,50	13,30	14,24
Triptofano	2,08	2,02	1,94	1,87	1,70	1,93	1,74

Fonte: CHIBNALL et alii (1963)

Uma vez constatada a relativa uniformidade de composição existente entre as folhas de diferentes espécies, pode-se concluir que qualquer planta pode representar uma fonte potencial para a produção de concentrados protéicos de folhas. A escolha da matéria-prima a ser utilizada deve recair sobre espécies capazes de fornecer o maior rendimento em termos de produção de proteína por hectare, e que apresente boas características de extratibilidade da proteína.

O rendimento em proteína, entretanto, não depende somente das características da planta. Muitos fatores agrônômicos e culturais podem exercer influência determinante.

A colheita antes ou após o momento ideal, mesmo que a diferença seja de poucos dias, pode causar considerável queda no rendimento. O momento ideal para a colheita, visando a extração das proteínas das folhas, para a maior parte das culturas, coincide com o estágio que antecede a floração, embora em alguns casos possa estender-se até estágios mais ou menos avançados da floração. Dentre os fatores culturais, observa-se que o uso de fertilizantes pode exercer importante papel no rendimento, em especial a adubação nitrogenada, que induz crescimento vegetativo mais intenso. A irrigação exerce influência tanto sobre o rendimento, quanto sobre a extratibilidade (FIORENTINI & GALOPPINI, 1983).

De acordo com o que foi exposto, conclui-se a que a escolha da matéria-prima deve recair sobre plantas que

apresentem alta eficiência de fotossíntese, reajam bem à adubação nitrogenada ou fixem nitrogênio atmosférico, sintetizem proteínas rapidamente e lignifiquem lentamente.

Outro aspecto a ser considerado é o aproveitamento de resíduos vegetais, como plantas aquáticas, folhas de beterraba, de cenoura, de feijão e de batata (OELSHLEGEL JR., et alii, 1969).

2.2. O AGUAPÉ COMO MATÉRIA-PRIMA PARA A PRODUÇÃO DE CONCENTRADOS PROTÉICOS DE FOLHAS

O aguapé [*Eichhornia crassipes* (Mart., 1825) Solms)] é uma planta aquática vascular de água doce e encontra-se distribuída em todos os continentes, nas latitudes semi-tropicais e em alguns países de clima temperado. Pertence à classe das Monocotiledoneas, família Pontederiaceae. Morfologicamente, é constituída de um talo vertical, chamado rizoma, do qual partem raízes e folhas; o rizoma flutua logo abaixo da superfície da água, protegido por um certo número de folhas. Sua propagação pode ser através de sementes ou de estolões, sendo esta última a mais significativa (JOLY, 1966). A Figura 1 mostra uma planta de aguapé.

O aguapé possui crescimento médio de 8% ao dia, variando com as condições locais, o que significa que pode dobrar de peso em apenas 12 dias. A sua produtividade pode atingir 360 a 480 t/ha . ano (KNIPLING et alii, 1970; WOLVERTON & McDONALD, 1979).

Figura 1. Aguapê (*Eichhornia crassipes*).

A alta produtividade do aguapê é responsável por uma série de problemas causados por essa planta. Segundo a CESP (1981), na geração de energia elétrica o aguapê provoca o entupimento das grades de proteção das tomadas de água, com conseqüências na operação das máquinas. Devido à sua constituição, com aproximadamente 95% de água, e à sua anatomia, que aumenta a área de superfície da interface água-ar, essa planta

causa, por evapotranspiração, um aumento entre 50 e 300% na quantidade de água evaporada em relação a uma mesma área de água sem aguapé; tal problema torna-se muito sério em épocas de estiagem, principalmente nas usinas que funcionam em regime de fio de água (sem reservatório). WOLVERTON (1979) destaca também a importância da evapotranspiração do aguapé em reservatórios de água para irrigação, principalmente em regiões semi-áridas.

Inúmeras alternativas têm sido propostas para resolver o problema da proliferação do aguapé. Uma delas é a utilização de herbicidas, que é apenas um paliativo, pois não resolve o problema de maneira definitiva, além de ser desaconselhável, por provocar um grande aumento no DBO (demanda biológica de oxigênio), com conseqüências no equilíbrio do sistema ecológico local, além do agravante de ser uma prática dispendiosa.

No caso de represas de usinas hidrelétricas, a descarga do aguapé através das comportas dos reservatórios é a solução mais utilizada quando a planta acumula-se nas regiões próximas às barragens; esse procedimento cria sérios problemas, como a perda de água, a conseqüente perda de energia e a transferência do problema para jusante (CESP, 1981).

Vários programas têm sido desenvolvidos visando o aproveitamento do aguapé. Em experimentos realizados pela NASA (National Aeronautic and Space Administration), dos Estados Unidos, foi observado o excepcional comportamento desta

planta quando cultivada em tanques abastecidos com esgotos domésticos. Houve reduções da ordem de 95% na DBO, e da ordem de 90% nos sólidos em suspensão, com reduções significativas nos teores de nitrogênio e fósforo, do líquido efluente (WOLVERTON & McDONALD, 1979). Segundo KNIPLING *et alii* (1970), essa propriedade é devida Pa habilidade do aguapê de incorporar altas quantidades de nutrientes em seus tecidos.

Em Piracicaba, o CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura), da Universidade de São Paulo, em convênio com a Comissão Nacional de Energia Nuclear, testou em escala piloto, um processo de despoluição de água contendo resíduos domésticos e industriais. Esse sistema envolveu a passagem da água por 2 tanques, nos quais foi cultivado o aguapê, havendo considerável redução da DBO

A composição química do aguapê, como de outras plantas, é variável com as condições de cultivo, conforme foi demonstrado por WOLVERTON & McDONALD (1979), sua qualidade nutricional é bastante aumentada quando as plantas crescem em águas fertilizadas, como é o caso de lagoas de tratamento de esgoto doméstico. Nas condições de cultivo em águas residuais

estritamente domésticas, os autores não detectaram a presença de metais pesados, como mercúrio e cádmio.

KNIPPLING et alii (1970) analisaram o aguapé e observaram a seguinte composição: N - 1,75; Ca - 3,06; P - 0,63; K - 3,07 e Mg - 0,63, em porcentagem na matéria seca. A Tabela 2 mostra a composição química do aguapé.

Tabela 2. Composição química do aguapé.

Aguapé	Proteína bruta	Lipídeos totais	Carboidratos totais	Fibra	Cinza
	(porcentagem em peso seco)				
	----- % -----				
Folhas ¹	27,75	6,62	22,64	21,5	21,4
Integral ²	22,90	2,12	ND ³	18,3	17,8

1 - Plantas coletadas em canais de Alexandria (Egito), segundo ABO BAKR et alii (1984).

2 - Plantas coletadas em lagoas de tratamento de esgoto na Flórida (Estados Unidos), segundo WOLVERTON & McDONALD, (1979).

ND³ - não determinado

Com relação à qualidade da proteína, foi verificado que todos os aminoácidos essenciais estão presentes e as folhas de aguapé apresentam composição comparável à da farinha de soja, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Aminoácidos de farinha de soja, de aguapé seco e de folhas secas de aguapé.

Aminoácido	Concentração em g/100g de proteína bruta		
	Farinha de soja ¹	Folhas de aguapé ¹	Aguapé ²
Fenilalanina	5,37	5,42	5,01
Isoleucina	4,90	4,66	4,54
Leucina	7,98	8,26	7,92
Lisina	6,49	5,68	6,57
Metionina	1,37	1,40	2,26
Treonina	4,26	4,34	4,03
Triptofano	-	0,99	1,51
Valina	4,80	5,55	5,09
Ácido aspártico	12,18	12,03	8,73
Ácido glutâmico	19,36	11,01	11,77
Alanina	4,58	6,19	5,64
Arginina	6,98	5,23	6,09
Glicina	4,48	5,14	5,00
Histidina	2,63	2,20	2,75
Prolina	5,29	6,00	5,62
Serina	5,51	4,08	3,85
Tirosina	3,94	3,38	2,31
Proteína bruta	44,5	31,3	16,0

Fontes: 1 - WOLVERTON & McDONALD (1979).

2 - MITSUDA *et alii* (1978).

WOLVERTON & McDONALD (1979), consideram como uma das possíveis utilizações do aguapé a produção de concentrados protéicos. Em caráter preliminar, prepararam e analisaram um concentrado protéico de folhas de aguapé contendo 57,8%

de proteína bruta, 4,77% de cinza, 2,16% de fibra bruta, 0,403% de fósforo e 0,422% de potássio.

Na Tabela 4 está representada a composição química de concentrado protéico de aguapê obtido por ABO BAKR *et alii* (1984) a partir de folhas de aguapê coletadas em canais de Alexandria, no Egito.

Tabela 4. Composição de concentrado protéico de folhas de aguapê.

	Porcentagens (a)
Nitrogênio	7,94 ± 0,34
Proteína bruta	49,60 ± 0,34
Lipídeos totais	16,01 ± 0,27
Carboidratos totais (b)	26,88 ± 0,32
Fibra bruta	1,70 ± 0,45
Cinza	5,81 ± 0,21
Minerais	mg/100g
Ferro	41,88 ± 0,15
Cálcio	20,84 ± 0,21
Magnésio	12,50 ± 0,18
Manganês	22,14 ± 0,17
Cobre	16,00 ± 0,24
Zinco	18,37 ± 0,22
Potássio	710,00 ± 0,56
Sódio	200,00 ± 0,61

(a) média das análises de 7 amostras

(b) por diferença

Fonte: ABO BAKR *et alii* (1984).

A composição em aminoácidos dos concentrados protéicos de aguapê produzidas por TAYLOR & ROBINS (1968), MITSUDA *et alii* (1978), WOLVERTON & McDONALD (1979) e ABO BAKR *et alii* (1984), consta na Tabela 5.

Tabela 5. Aminoácidos de concentrados protéicos de aguapê em comparação com a proteína padrão da FAO.

Aminoácidos	Concentração em g/100g de proteína				
	Concentrados protéicos de aguapê				Padrão
	Folhas (1)	Folhas (2)	Folhas (3)	Integral (4)	
Fenilalanina	6,10	6,0	10,62 (6)	-	2,8
Isoleucina	4,92	5,3	5,43	4,93	4,2
Leucina	9,20	9,80	9,13	8,11	4,8
Lisina	6,80	6,3	5,84	6,91	4,2
Metionina	2,06	2,1	3,44 (7)	-	2,2
Tirosina	4,67	4,2	-	-	2,8
Treonina	4,99	5,2	5,13	4,23	2,8
Triptofano	1,50	-	-	1,41	1,4
Valina	5,84	6,3	7,02	5,66	4,2

(1) Segundo WOLVERTON & McDONALD (1979).

(2) Segundo TAYLOR & ROBINS (1968).

(3) Segundo ABO BAKR *et alii* (1984).

(4) Segundo MITSUDA *et alii* (1978).

(5) Segundo WOLVERTON & McDONALD (1979).

(6) Fenilalanina + Tirosina

(7) Metionina + Cistina

Pela observação da Tabela 5, verifica-se que o concentrado protéico de aguapê apresenta deficiência em apenas um aminoácido essencial, a metionina; por outro lado, pode

ser notado que o teor desse aminoácido no concentrado de aguapê é maior que o encontrado na farinha de soja, uma fonte de proteínas já aceita e utilizada. Chama atenção ainda, o alto teor de lisina encontrado no concentrado de aguapê, o que sugere sua utilização como um suplemento para dietas à base de cereais que são deficientes neste aminoácido.

2.3. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS E PREPARAÇÃO DOS CONCENTRADOS DE FOLHAS

2.3.1. Extração das proteínas

Segundo KOHLER & LYON (1977) o primeiro passo para a extração de grandes quantidades de proteínas das folhas é o rompimento das paredes celulares de células do mesófilo não aquecidas, e portanto, com proteínas não desnaturadas. Um importante ponto a ser considerado no processo de extração é que a ruptura das paredes celulares promove uma mistura de enzimas e substratos que leva à ocorrência de problemas como a rápida perda de proteína pela atividade de proteases em alfafa desintegrada ou em suco verde e a rápida perda de carotenóides pela ação de lipoxigenase. Estas reações enzimáticas podem ser inibidas ou retardadas pela elevação do pH até 8,0 ou por refrigeração. Se a colheita, transporte e processamento são feitos rapidamente os danos são pequenos. Outra consideração importante refere-se ao fato de que quando as paredes celulares são rompidas o conteúdo dos vacúolos mistura-se com

o citoplasma e suas organelas. O vacúolo é um reservatório de metabólitos, como os compostos fenólicos, que reagem com as proteínas tornando-as insolúveis.

A extração das proteínas de folhas, para a produção de concentrados protéicos para a alimentação animal e humana é possível, segundo FIORENTINI & GALOPPINI (1983), através da utilização da tecnologia de fracionamento das folhas, que consiste, basicamente, de uma operação mecânica de desintegração e prensagem que separa o material inicial em 2 frações: um suco protéico e um bolo prensado. O grau de extração exerce um efeito considerável nas características dessas duas frações; são reconhecidos três diferentes graus de extração - leve, parcial e intensa.

A extração leve é utilizada na secagem de forragens e visa remover o máximo da água com a mínima perda de suco pelo material seco, nesse caso, o suco não é processado, pois o seu teor de matéria seca é muito baixo, assim como o teor protéico.

A extração parcial baseia-se no fato de que muitas plantas utilizadas como forrageiras, como a alfafa, apresentam teor protéico maior que o requerido pelos ruminantes. Por meio dessa extração, obtém-se um material prensado adequado às necessidades nutricionais dos ruminantes e um suco contendo as proteínas consideradas em excesso, que pode ser processado para ser usado na alimentação humana ou de animais mo-

nogástricos. Um procedimento semelhante vem sendo estudado por FANTOZZI & SENSIDONI (1983) visando extrair parte das proteínas de folhas de fumo antes da produção do cigarro, o que é conseguido por uma desintegração parcial das folhas, que mantêm a conformação estrutural adequada à confecção dos cigarros e possibilita a utilização de parte das proteínas das folhas.

O objetivo da extração intensa é recuperar o máximo de proteína possível. Nesse caso, o resíduo fibroso tem importância secundária e maior atenção é dada à preparação de produtos protéicos a partir do suco. Esse processo inclui uma vigorosa prensagem, que normalmente é feita em duas vezes e precedida de um tratamento adequado como desintegração ou alcalinização. O resíduo fibroso é rico em fibra e pobre em proteínas, portanto, de baixo valor nutritivo.

O suco obtido através da extração parcial ou intensa possui alto teor de matéria seca, normalmente mais de 10%. O teor protéico é alto o suficiente (30 a 40% na matéria seca) para tornar viável a produção de concentrados protéicos para a alimentação animal e humana (FIORENTINI & GALOPPINI, 1983).

Segundo KOHLER & KNUCKLES (1977), o suco de alfafa contém 35 a 60% da proteína bruta, mas somente cerca de um terço dos sólidos do material bruto. Os dois terços restantes dos sólidos compõe o bolo prensado, que é quantitativamente o principal produto do processo. Vários procedimentos

foram descritos para a utilização do suco protéico, que pode ser utilizado diretamente na alimentação animal, ou pode ser seco e utilizado como suplemento na alimentação animal, em especial de suínos. A vantagem do uso do suco seco reside no fato de que o material é microbiologicamente estável podendo ser armazenado, entretanto, o custo de secagem é elevado, além disso, o teor de cinzas é muito alto e o de proteínas não é alto o suficiente (cerca de 33%) para que este produto possa competir favoravelmente com produtos derivados da soja.

Segundo PARRISH et alii (1974) o primeiro fator a influenciar a quantidade de proteína extraída das folhas é a espécie vegetal, pois plantas de diferentes espécies apresentam diferentes relações proteína/fibra, a extração de quantidades mais elevadas de N protéico é possível para plantas que apresentam maiores teores de proteína em relação à fibra, pois o material fibroso tende a aprisionar a proteína durante a prensagem tornando-a não disponível para a extração. Constatou-se também que existe uma relação linear entre a quantidade de N extraída e o teor de umidade das folhas, o que se relaciona diretamente com a idade das folhas.

BETSCHART & KINSELLA (1973) observaram que a extratibilidade de proteína de folhas é influenciada por vários fatores. Entre eles, o método empregado para romper as paredes celulares e os cloroplastos, a espécie vegetal e o estágio de maturação, a presença de material mucilaginoso, o tratamento pós-colheita, o pH e a composição do extrator empregado e

o tempo e a temperatura de extração. Esses autores estudaram a influência da adição de sacarose durante a extração e concluíram que a sacarose aumenta o rompimento dos cloroplastos, pela sua influência na pressão osmótica e também contribui para minimizar a agregação e precipitação das proteínas na etapa de extração, tendo efeito positivo na extratibilidade das proteínas de alfafa. O uso de detergente (0,5%) também foi estudado e não foi notada influência no grau de extração das proteínas, apesar do efeito do detergente no rompimento dos cloroplastos, já observado por outros pesquisadores.

LU & KINSELLA (1972) testaram o efeito de tratamento da alfafa com celulose, para determinar a influência das fibras e polissacarídeos presentes na extratibilidade das proteínas e concluíram que o tratamento enzimático proporcionou um aumento muito pequeno no grau de extração das proteínas.

Para BUTLER (1982) qualquer que seja a técnica empregada, os fatores que afetam a porcentagem da proteína que pode ser extraída podem ser divididos em três categorias: os fatores que influenciam a eficiência da desintegração e a extensão em que o conteúdo das células é liberado, os fatores que influenciam a eficiência da prensagem e o grau de separação do suco e de fibra, e os fatores relacionados a composição química da folha que determinam o quanto as proteínas são solúveis. O autor observou que para várias espécies a porcentagem de proteína extraída diminui com a idade, e existem considerá-

veis diferenças entre espécies para um mesmo estágio de maturidade. Algumas plantas, como o girassol, embora sejam produtoras de grandes quantidades de proteína não podem ser usadas para a produção de concentrados protéicos de folhas devido à baixa extratibilidade das mesmas.

Dentre os fatores que influenciaram a extratibilidade das proteínas de folhas, DAVYS & PIRIE (1969) ressaltam a importância do período entre a colheita e o processamento, pois durante a colheita, parte das células se rompe e há a liberação de enzimas responsáveis pela proteólise. Segundo esse autor, há uma redução de 43% na produção do concentrado protéico se o material colhido for deixado a 23°C por 1 hora depois de prensado.

DE FREMERY *et alii* (1973) mostram que a proteólise é dependente do tempo pós-colheita e aumenta rapidamente com a elevação da temperatura. Os autores recomendam que se evite danos às folhas durante a colheita, para reduzir a liberação das enzimas proteolíticas. A atividade da enzima é reduzida a pH 8,0 e, portanto, a adição de hidróxido de amônio na colheita prolongará o tempo de espera para o processamento. KOHLER & KNUCKLES (1977) sugerem o uso de inibidores enzimáticos, como uma alternativa para o ajuste do pH.

PARRISH *et alii* (1974) observaram que ocorre redução de 30% na proteína extraível quando as folhas são armazenadas durante 24 horas à temperatura ambiente antes do processamento devido à atividade das enzimas proteolíticas.

A presença de enzimas proteolíticas e oxidativas nos extratos de folhas pode dificultar a recuperação da proteína. As enzimas fenol oxidase e peroxidase catalizam a redução de fenóis e quinonas que, em presença de oxigênio, polimerizam e complexam com proteínas, reduzindo sua solubilidade e digestibilidade. BETSCHART & KINSELLA (1973) relatam que a formação desses complexos é inibida pela extração das proteínas de folhas na presença de agentes redutores e pela remoção das substâncias fenólicas com polivinilpirrolidona (PVP).

A porcentagem de proteína extraída de folhas, como já foi visto, varia com a espécie, idade da planta e com o processo usado.

CHAYEN *et alii* (1961) demonstraram que é possível extrair de 75 a 85% da proteína das cinco espécies por eles estudadas, mostraram que o principal problema no isolamento de proteínas de folhas em grandes quantidades é a dificuldade de romper as células e sugeriram o uso da plasmólise através do uso de misturas de água e éter e tratamento mecânico adequado para aumentar o grau de extração.

BYERS (1961) estudou a extratibilidade da proteína de folhas de 60 espécies tendo encontrado resultados variando de 4,8 até 65,5%.

LU & KINSELLA (1972) observaram que na faixa de 25 a 70°C, com um aumento na temperatura de extração há um aumento correspondente na extratibilidade do N e da proteína,

pois mais cloroplastos, vacúolos e demais componentes que contêm proteína são rompidos pelo calor. Os mesmos autores observaram que a porcentagem média de proteína de alfafa que é extraída é de 45%, embora tenham sido relatados valores mais baixos (30%) e mais elevados (61,6%). KOHLER & KNUCKLES (1977), também relataram porcentagens de extração de 35 a 60%. KUCKLES *et alii* (1972) observaram que a introdução de uma operação a mais de prensagem durante a produção de concentrado protéico de alfafa aumentou a porcentagem de extração de 40 para 43%. A porcentagem de extração de proteínas de alfafa encontrada por FIORENTINI & GALOPPINI (1981) também encontra-se na faixa média relatada na literatura em geral (47%).

MITSUDA *et alii* (1978) observaram a extração de 54,9% das proteínas de folhas de aguapê usando NaOH 0,05M na proporção de 3 extrator: 1 aguapê. ABO BAKR *et alii* (1984) extraíram 55,21% das proteínas de aguapê.

2.3.2. Produção de concentrados integrais

Vários processos foram desenvolvidos para a preparação de concentrados protéicos de folhas, com complexidade variável conforme a finalidade de cada um, desde a produção de suco verde desidratado até a obtenção de proteínas na forma cristalina. A maior parte desses processos envolve a separação mecânica das proteínas do suco, após sua coagulação ou insolubilização.

ALTSCHUL (1974) resume a produção de concentrados protéicos de folhas como sendo a coagulação da suspensão coloidal verde dos cloroplastos, que é composta de sais solúveis, aminoácidos, proteínas e outras substâncias. Esse coágulo é obtido por aquecimento ou acidificação e separado por flotação, centrifugação ou filtração e a seguir, é seco.

Visando a obtenção de um produto com teor protéico mais elevado foi desenvolvido o processo Pro Xan, que segundo DE FREMERY et alii (1973), separa uma porção da proteína e pigmentos carotenoides do suco extraído da alfafa, resultando num produto que é essencialmente isento de fibra. O produto é chamado Pro Xan por causa de seu alto teor de proteína e xantofila e é atualmente produzido comercialmente por um equipamento processador de alfafa com denominação comercial X-PRO, tendo boa aceitação na indústria de alimento para animais não ruminantes.

O processo Pro Xan foi descrito por KOHLER & KNUCKLES (1977) e possibilita a obtenção de proteínas em grande escala e custo baixo. Neste processo a alfafa picada é tratada com amônia ou hidróxido de sódio, até o pH do suco atingir 8,5, em seguida é desintegrada para que as células sejam rompidas. A alfafa moída sofre prensagem que extrai aproximadamente 55 - 65% do peso total como suco verde. As proteínas do suco são coaguladas por aquecimento a 80 - 95°C por 1 a 2 minutos por injeção de vapor e são separadas por centrifugação

ou por prensagem. O material obtido contém de 40 a 50% de sólidos e sofre secagem à temperaturas entre 60 a 80°C. O produto obtido (concentrado protéico integral ou Pro-Xan) apresenta coloração verde muito intensa, baixo teor de fibra e altos teores de proteína e xantofila e é empregado na alimentação animal.

A necessidade de se elevar o pH do suco, decorre do fato de que uma grande parte do volume total da célula é ocupado pelo vacúolo, cujo conteúdo é ácido; quando a membrana que separa o protoplasma do vacúolo é rompida na operação de moagem, estabelece-se uma condição ácida que, segundo WILDMAN & JAGENDORF (1952) causa a coagulação das proteínas solúveis e a agregação das estruturas particulares, o que dificulta a extração das proteínas.

SPENCER et alii (1971) explicam que a amonização da alfafa até pH 8,5 reduz as perdas de caroteno e xantofila durante o processo de aquecimento que se segue ao de coagulação. Se a condição alcalina for sempre mantida, a extração protéica será aumentada. A amonização pode ser feita por contato direto com hidróxido de amônio concentrado. Após a precipitação a 85°C por injeção de vapor, é feita a decantação em sacos de "nylon" e a prensagem em prensa hidráulica. Por este processo, o autor obteve bom rendimento sem a moagem inicial.

BETSCHART & KINSELLA (1973), trabalhando com alfafa, conseguiram extração máxima a pH 12, mas consideram que

as extrações devem ser feitas entre pH 7 e 8, pois o aumento na solubilidade causado pela alcalinização adicional, não compensa uma possível desnaturação na proteína final. Foi testada também a utilização de "buffers" para controlar a acidificação que ocorre durante a meceração como resultado da liberação dos ácidos orgânicos dos vacúolos e concluiu-se que o uso de "buffer" tem efeito positivo na extração das proteínas da alfafa. Já os resultados de um outro trabalho, publicado por LU & KINSELLA (1972) mostram que a extratibilidade da proteína de alfafa não é alterada significativamente pelo uso de soluções com ou sem "buffers", desde que se trabalhe com pH elevado.

Segundo MORRISON & PIRIE (1961) na precipitação das proteínas em larga escala usa-se normalmente o aquecimento como agente de coagulação, pois a textura do coágulo obtido é melhor do que a de coágulos obtidos exclusivamente por acidificação, propiciando melhores resultados na operação de filtração. Por esta razão a proteína é invariavelmente precipitada por aquecimento a 75-80°C, sendo necessária a acidificação até valores de pH menores que 6, pois o pH também exerce influência sobre a consistência do coágulo formado.

O rendimento típico do processo Pro Xan é mostrado na Tabela 6. Os dados são baseados em processamento que envolve a reciclagem do suco "marrom" ou sobrenadante após a separação do precipitado protéico e por esta razão o rendimento é melhor que os normalmente relatados.

Tabela 6. Distribuição de sólidos no sistema Pro-Xan.

	Peso seco (%)	Proteína bruta (% da original)
Sólidos	100	-
Proteína bruta	20	100
Proteína solúvel	7	-
Produtos do processo Pro Xan		
CPF integral	18	52
Resíduo fibroso	65	33
suco "marrom"	17	15

Fonte: KOHLER & DE FREMERY (1977).

O processo descrito para a produção de concentrado integral (contendo as duas frações protéicas) pode ser utilizado para a produção de concentrados protéicos para a alimentação humana, mediante a inclusão de operações de purificação, que visam a obtenção de um produto aceitável, sob o ponto de vista higiênico e incluem a lavagem da matéria-prima, a clarificação do suco e a lavagem do produto final. FIORENTINI & GALOPPINI (1983) consideram que, uma vez lavado, o concentrado pode ser usado diretamente em alimentos.

PARRISH et alii (1974) descreveram a extração das proteínas do suco com o uso de solventes orgânicos como acetona ou butanol. O método consiste na desintegração e prenagem das folhas e tratamento do suco protéico com o solvente. Um precipitado se forma e é deixado por uma noite a 4°C, então,

é filtrado e lavado com o mesmo solvente usado na extração até que o produto apresente-se sem cor. É finalmente seco por ar ou sob baixa pressão. O material protéico obtido por este método tem teor de cinza mais elevado (aproximadamente 17%) que o concentrado obtido por precipitação pelo calor. Isto deve-se à coprecipitação de solutos inorgânicos. O teor de lipídeos é muito baixo (1 a 2%). Etanol é mais eficaz que acetona na separação da porção lipídica, uma vez que quebra os complexos fosfolipídeos - proteína que são precipitados pela acetona. O teor de N na matéria seca deste produto é levemente superior ao obtido pelo aquecimento. Dependendo da utilização que se pretende dar ao concentrado, este método pode ser mais ou menos vantajoso. O alto teor de lipídeos precipitado pelo calor representa um problema no armazenamento devido a rápida oxidação da gordura a baixos teores de umidade. Este problema é virtualmente eliminado com a extração por solvente, uma vez que os teores finais de lipídeos são muito baixo.

2.3.3. Produção de concentrados despigmentados

Os concentrados protéicos integrais, mesmo apresentando alto valor nutricional e baixo custo de produção, não tem grande aceitação, principalmente devido ao "flavor" desagradável e à cor verde escura. Alguns processos foram desenvolvidos, visando diminuir esses problemas; esses processos podem ser divididos em dois grupos: o primeiro grupo envolve a produção de concentrados integrais descoloridos e o segundo,

a preparação de concentrados "brancos", pela separação das duas frações protéicas presentes no suco.

2.3.3.1. Concentrados integrais despigmentados

O uso de solventes na purificação de concentrados integrais tem sido estudado. A eficiência de diferentes solventes, em aumentar a aceitação de concentrados integrais pela remoção da cor e do "flavor" é o objetivo de várias pesquisas.

De acordo com BRAY et alii (1978) o "flavor" característico dos concentrados protéicos de folhas deve-se a compostos da fração lipídica e a produtos formados pela oxidação de ácidos graxos insaturados. A cor deriva de 3 fontes: pigmentos naturais da folha - clorofila e carotenóides, produtos de oxidação de polifenóis e produtos da reação de Maillard. Os pigmentos da planta são de natureza lipídica e podem ser extraídos com solventes. Na mesma extração, remove-se material lipídico não pigmentado e o problema da cor é diminuído. Solventes orgânicos, capazes de formar pontes de hidrogênio, podem ser usados para dissociar complexos de proteína e substâncias fenólicas, com conseqüente remoção dos fenóis. Dessa maneira, a extração com solventes é um caminho para reduzir os problemas de aceitabilidade dos concentrados de folhas.

Foi observado que não se consegue uma boa extração usando o concentrado seco, por essa razão a operação de ex

tração deve ser feita antes da secagem no material protéico se parado por centrifugação ou por outro meio. BRAY et alii (1978) testaram solventes polares, não polares e misturas de ambos e concluíram que os solventes polares são mais eficientes, por várias razões. Como a extração é feita no material antes da secagem, o que se tem é um meio aquoso (50% de umidade) e o solvente remove inicialmente a água e depois os lipídeos, os solventes polares removem também os compostos fenólicos responsáveis pelo escurecimento do produto durante o aquecimento. Dentre os solventes polares testados, foram conseguidos bons resultados com acetona, etanol e butanol. Segundo esses autores, a extração com solventes tem também o efeito positivo de aumentar o teor protéico do produto final, como uma consequência da redução do teor de lipídeos.

FIORENTINI & GALOPPINI (1983) consideram o alto custo operacional o fator que limita a utilização da extração por solventes, embora a qualidade do concentrado descolorido seja boa. O custo do solvente é muito alto em relação ao produto final. BRAY et alii (1978) mostram que a proporção ideal de 15 solventes: 1 de amostra perde-se aproximadamente 0,5kg de solvente por kg de concentrado descolorido e a destilação e recuperação do solvente é um processo que envolve alto consumo de energia. Esses fatores tornam o processo de extração por solventes economicamente inviável, nas condições atuais.

KOHLER & KNUCKLES (1977) observaram ainda que

devido à intensa extração com solventes necessária para remover os pigmentos responsáveis pela coloração verde no concentrado, o material protéico final tende a apresentar-se com coloração cinza e não branca.

2.3.3.2. Concentrados protéicos "brancos" ou "citoplasmáticos"

Uma outra maneira de se obter concentrado protéico "brancos" é o fracionamento do suco em duas partes: uma fração verde e outra fração "branca". Como já foi visto, aproximadamente metade das proteínas do suco consiste de lipoproteínas em dispersão coloidal, associadas aos cloroplastos e a outra metade é composta de proteínas em solução verdadeira, sendo uma parte de proteínas do citoplasma e outra, de proteínas dos cloroplastos livres de clorofila. Os métodos de separação das duas frações protéicas baseiam-se nas diferenças das propriedades físico-químicas observadas entre as duas.

Segundo FIORENTINI & GALOPPINI (1983) a fração insolúvel pode ser facilmente aglomerada e removida por centrifugação ou filtração ou pode ser diretamente removida por ultracentrifugação.

As duas frações protéicas, solúvel e insolúvel, têm sido descritas como citoplasmáticas e cloroplásticas. Segundo FIORENTINI & GALOPPINI (1983) a fração cloroplástica consiste de lipo-proteínas insolúveis associadas à clorofila, que podem ser facilmente desestabilizadas e isoladas, esta fra

ção apresenta coloração verde escura e forte "flavor". A segunda fração parcialmente originada no citoplasma e por esta razão chamada citoplasmática consiste de proteínas solúveis relativamente estáveis que quando isoladas não apresentam odor ou gosto e são de coloração branca ou creme. Segundo os autores a fração cloroplástica, ou seja, insolúvel, é facilmente aglomerada e separada por centrifugação ou filtração. Também pode ser diretamente removida por ultracentrifugação, mas como este processo é muito caro e até hoje não é viável em larga escala, o material cloroplástico deve ser desestabilizado para possibilitar sua separação. Esta desestabilização para possibilitar

sua separação. Esta desestabilização pode ser conseguida pelo aquecimento a aproximadamente 60°C ou pela adição de polieletrólitos ou solventes orgânicos. Depois que o material cloroplástico for removido, as proteínas solúveis podem ser recuperadas do líquido sobrenadante de várias maneiras (coagulação ácida ou pelo calor, e ultracentrifugação). O material não protéico solúvel é então removido por lavagem e o concentrado protéico final é obtido por secagem em leito fluidizado ou por processo similar. Vários processos têm sido estudados tanto para a preparação em laboratório como em planta piloto para a obtenção de um concentrado protéico citoplasmático para o consumo humano.

Segundo DE FREMERY et alii (1973) foram descritos vários métodos para a obtenção de concentrados protéicos de folhas sem clorofila a partir do suco de diferentes espê-

cies, tendo sido relatado o emprego de precipitação diferencial por sulfato de amônia ou ácidos diluídos além da separação parcial usando sais de cálcio como agente flocculante para os fragmentos cloroplásticos. O método mais comum, entretanto, consiste no emprego de tratamento térmico diferenciado com os fragmentos cloroplásticos coagulando à temperaturas mais baixas que as proteínas "brancas".

Dentre os vários processos propostos para a produção de concentrados protéicos "brancos", ressalta-se a importância do processo Pro-Xan II. O processo Pro-Xan II foi testado em laboratório e em escala piloto. A fração verde é aglomerada por aquecimento a $60 - 65^{\circ}\text{C}$ por 20 seg. e separada por centrifugação ou filtração. As proteínas solúveis remanescentes são isoladas do sobrenadante por precipitação, mediante aquecimento a 80°C seguido de centrifugação. O concentrado obtido, chamado "welpro" (white edible leaf protein) é lavado e seco. O rendimento do concentrado "branco" é de aproximadamente 1/4 do concentrado total produzido e contém 88,7% de proteína bruta, 0,6% de lipídeos, 1% de fibra bruta, 0,4% de cinza, 9,3% de extrativo não nitrogenado e 0,3% de sólidos solúveis (FIORENTINI & GALOPPINI, 1983).

EDWARDS et alii (1975) testaram o processo Pro Xan II em escala piloto. O concentrado "welpro" obtido neste experimento apresentou 90% de proteínas e teores desprezíveis de lipídeos, fibra e cinza, sua coloração clara e leve sabor

diminuem os problemas de aceitabilidade dos concentrados de folhas. O "welpro" pode ser usado como um suplemento para a alimentação humana. A fração verde, chamada Pro Xan II, obtida contém aproximadamente 50% de proteínas, alto teor de lipídeos, baixo teor de fibras e teor muito alto de xantofila, assim como o Pro Xan, é um bom suplemento para a alimentação de animais monogástricos, em especial suínos e aves.

Os rendimentos obtidos pelos autores para Pro Xan II e "welpro" foi respectivamente 6,8% e 2,0% em porcentagem de peso, segundo os autores estes valores podem ser melhorados mediante modificações nas operações de prensagem e desintegração.

O teor de proteína bruta em folhas de alfafa, encontrado pelos autores foi de 21,5%. Partindo deste valor, do rendimento de suco verde, do teor de proteína solúvel no suco e da premissa que do total de proteína bruta das folhas aproximadamente 1/3 é composto por proteínas em solução, 1/3 é composto por proteínas insolúveis e 1/3 por material nitrogenado não protéico, EDWARDS et alii (1975) calcularam que 45,6% da proteína solúvel foi extraída na separação do suco, enquanto que os 54,4% remanescentes permaneceram no bolo prensado. O "welpro" representou 8,7% da proteína bruta original e 26,1% da proteína solúvel presente na alfafa fresca. O "welpro" também apresentou uma recuperação de aproximadamente 57% da proteína solúvel presente no suco.

MILLER *et alii* (1975) apontam como uma desvantagem do concentrado branco obtido pelo processo Pro Xan II, sua baixa solubilidade, devida ao aquecimento sofrido no estágio de precipitação e sugerem que a fração protéica solúvel seja precipitada por acidificação, o que preserva sua solubilidade original. Outro problema inerente ao processo Pro Xan II, segundo KNUCKLES *et alii* (1980) é o fato de que o aquecimento a 56 - 65°C usado para separar o material verde, é responsável pela coagulação de 20 a 40% das proteínas solúveis que são precipitadas e separadas em conjunto com a fração verde, com conseqüente queda no rendimento do concentrado "branco".

DE FREMERY *et alii* (1973) confirmaram através de experimento que o aquecimento controlado seguido de sedimentação por centrifugação das proteínas cloroplásticas associadas aos pigmentos verdes teve um efeito mínimo sobre as proteínas solúveis "brancas". Os efeitos do pH, temperatura e o tempo de exposição foram exaustivamente estudados. Aumentando-se o pH reduz-se a desnaturação das proteínas solúveis, enquanto que aumento na temperatura ou no tempo de tratamento tem efeito oposto. Com o aumento da severidade de tratamento pH-temperatura-tempo de tratamento o sobrenadante torna-se mais claro, mas, a custo da redução no teor de proteínas solúveis, que são parcialmente precipitadas com a fração cloroplástica.

Uma vez que o aquecimento desnatura as proteínas, com conseqüências indesejáveis em suas propriedades fun-

cionais, como a solubilidade, pesquisadores do Instituto di Industrie Agrarie da Universidade de Pisa, na Itália, desenvolveram um processo para coagular as proteínas do suco usando polieletrólitos em vez de aquecimento. Os resultados, segundo FIORENTINI & GALOPPINI (1983) foram bastante promissores. BRAY & HUMPHRIES (1979) testaram vários flocculantes em combinação com diferentes condições de pH, para a remoção do material pigmentado do suco pela desestabilização das partículas cloroplásticas em suspensão coloidal. O flocculante que proporcionou melhores resultados foi o Superfloc Al50, um flocculante polianônico poliacrilamida. Por meio desse processo produziu-se um concentrado "branco" adequado para o uso em formulações alimentícias.

Com base nos bons resultados obtidos pelo uso do processo de fracionamento das proteínas com polieletrólitos foi desenvolvido um estudo em escala piloto, por FIORENTINI & GALOPPINI (1981). Segundo esses autores, a fração pigmentada é separada à temperatura ambiente pelo emprego do Superfloc Al50. Após a alcalinização do suco até pH 8,5, o polieletrólito é adicionado à concentração final de 18 ppm. Um decantador horizontal operando a 6.000 rpm é utilizado para separar a proteína verde coagulada. As proteínas remanescentes são coaguladas por acidificação a pH 4,0 e o coágulo formado é separado por centrifugação. Algumas propriedades funcionais do concentrado produzido foram avaliadas em formulações alimentícias. O perfil de aminoácidos desse concentrado também foi avaliado

e se mostrou adequado à alimentação humana. O processo descrito é chamado processo "Poly-Protein" e, atualmente, tem sido estudado por vários pesquisadores.

Segundo KNUCKLES et alii (1980) os floculantes promovem a aglomeração dos sólidos em suspensão em soluções aquosas. Têm sido usados na separação ou fracionamento das proteínas de extratos vegetais, mas são mais empregados na remoção de sólidos em suspensão no tratamento de água. Os autores testaram 54 floculantes comercialmente disponíveis para a separação das proteínas cloroplásticas das proteínas solúveis em extratos de folhas de alfafa, dentre os floculantes testados os que se mostraram mais eficazes foram os de natureza fortemente catiônica e com peso molecular variando de 100.000 a 300.000, foi observado que a quantidade ideal de floculante a ser empregada depende da quantidade de material sedimentável presente.

A técnica de ultracentrifugação também pode ser usada para isolar a fração protéica "branca" do suco. Segundo FIORENTINI & GALOPPINI (1983) pode-se obter um concentrado com um máximo de 60% de proteína na base seca. Segundo esses autores, o aumento da concentração de proteína só é possível pela remoção de componentes não protéicos por diálise e o concentrado obtido por esse método apresenta mais de 90% de proteínas no estado nativo, e, portanto, completamente solúveis.

Um processo para preparar concentrados "bran-

cos" com alta solubilidade foi desenvolvido pelo W.R.R.C. (USDA Western Regional Research Center, em Berkeley, Califórnia) e, segundo FIORENTINI & GALOPPINI (1983) consta de coagulação ácida à baixa temperatura e lavagem e ressuspensão em álcali do coágulo protéico. O processo é totalmente realizado a 2°C e o produto final contém aproximadamente 70% de proteína e pode ser facilmente redissolvido em água.

BRAY & HUMPHRIES (1978) usaram solvente para fracionar as proteínas do suco de folhas, visando a obtenção de um concentrado "branco", tendo conseguido resultados satisfatórios. O solvente causa a floculação das proteínas insolúveis, por um mecanismo ainda não totalmente conhecido, permitindo dessa maneira, sua separação por centrifugação. A proteína que permaneceu em solução após o tratamento com o solvente, foi precipitada por acidificação a pH 4,0, com HCl diluído e aquecimento a 40°C; após a precipitação, fez-se uma centrifugação seguida de lavagem com água destilada com pH 4,0 e nova centrifugação. O rendimento de proteína "branca" obtida por esse método foi relativamente baixo, variando de 1/4 a 1/8 da proteína total, dependendo da matéria-prima empregada. Segundo os autores, esse rendimento, embora baixo, é superior ao conseguido por outros métodos e como o concentrado não sofreu aquecimento, apresenta propriedades nutricionais e funcionais mais adequadas a sua utilização na alimentação humana. A maior desvantagem desse método é seu elevado custo.

Segundo SUBBA RAO *et alii* (1967) os concentrados protéicos de folhas tanto podem ser consumidos na forma fresca, como "bolo" após a operação de prensagem ou como um pó seco. A utilização de técnicas de secagem adequadas viabiliza a produção de concentrados protéicos em larga escala, pois o material úmido está sujeito ao ataque de microrganismos a menos que seja armazenado sob refrigeração. Por outro lado, nem sempre estão disponíveis os equipamentos necessários para a secagem, principalmente no caso de pequenas comunidades em locais pouco industrializados. A conservação do bolo protéico pode ser feita com o uso de sal em concentração de 12%, que previne o crescimento microbiano, mas limita sobremaneira a utilização do concentrado em preparações alimentícias, outra forma de conservação que tem proporcionado bons resultados é a utilização de vinagre ou ácido acético.

BUCHANAN (1969b) analisou os efeitos do armazenamento nas propriedades dos concentrados protéicos de folhas tendo observado reduções na digestibilidade após aquecimento causadas principalmente pelo aquecimento *in situ*, principalmente com altos teores de umidade e sendo que pouco ou nenhum dano a digestibilidade pode ser atribuído a oxidação de lipídeos e conseqüente formação de complexos lipídeos-proteínas.

2.4. VALOR NUTRICIONAL DOS CONCENTRADOS PROTÉICOS DE FOLHAS

2.4.1. Composição química

A composição química dos concentrados protéicos varia conforme a espécie usada como matéria-prima e com os métodos de processamento.

GERLOFF *et alii* (1965) prepararam concentrados protéicos integrais de folhas partindo de nove espécies cultivadas e colhidas sob diferentes condições, tendo observado variação no teor protéico dos concentrados de 31,5% a 83,8% com valor médio de 58,0%.

A maior parte dos dados disponíveis referem-se a preparação de concentrados protéicos de folhas de alfafa, em bora tenha sido descrito o aproveitamento de outras espécies, em especial dos resíduos vegetais. No caso da alfafa, os valores encontrados na literatura são bastante semelhantes e podem ser exemplificados pela Tabela 7.

Tabela 7. Comparação de concentrados protéicos de folhas de alfafa, porcentagens em peso seco.

Produto	Proteína bruta (%)	Lipídeos (%)	Fibra bruta (%)	Cinza (%)	Extrato não nitrog. (%)	Sólidos Solúveis (%)
Conc. integral (Pro Xan)	61,9	8,9	1,7	11,1	16,5	8,1
Fração verde (Conc. Pro Xan II)	45,3	13,3	4,4	15,6	21,5	7,9
Conc. branco	88,7	<0,6	<1,0	0,4	9,3	0,3

Fonte: KOHLER & KNUCKLES (1977).

A fração protéica dos concentrados têm sido bastante estudada e será analisada em 2.4.2.

Com relação à fração lipídica, vários estudos têm sido desenvolvidos tendo sido observado por LIMA *et alii* (1965) que os concentrados protéicos integrais, em geral, contêm de 3 a 8% de ácidos graxos, dos quais 74 a 80% são representados pelos ácidos linolênico, palmítico e linoleico, estando presentes pequenas quantidades dos ácidos oleico e palmitoleico. Os elevados teores de ácidos graxos essenciais encontrados em tecidos de folhas em geral nos concentrados protéicos de folhas em particular indicam que os lipídeos presentes exercem importante papel nutricional, tanto como fornecedores de energia quanto como fornecedores de nutrientes essenciais. Os autores não constatarem diferenças significativas nos teo-

res de ácidos graxos de concentrados protéicos de folhas de diferentes espécies.

Segundo FIORENTINI & GALOPPINI (1981) os teores de caroteno (387 ppm) e xantofila (913 ppm) do concentrado clo_{ro}plástico ou Pro Xan II são bastante elevados.

MORRISON & PIRIE (1961) afirmam que embora os ácidos nucleicos sejam importantes constituintes de folhas jovens, estão presentes em teores muito pequenos no concentrado final, pois a temperatura usada para a coagulação não é alta o suficiente para inativar as ribonucleases.

2.4.2. Qualidade da proteína de concentrados protéicos de folhas

A qualidade nutricional de uma proteína é determinada pela quantidade, disponibilidade e proporções dos aminoácidos essenciais e da presença em quantidades suficientes para utilização ideal de aminoácidos não essenciais (WOLZAK *et alii*, 1981).

A análise das concentrações de aminoácidos é o critério mais utilizado na avaliação da qualidade nutricional de uma proteína. Conforme foi visto em 2.1, a composição das proteínas de folhas de diferentes espécies varia muito pouco (BONDI, 1958; GERLOFF *et alii*, 1965; NAGI *et alii*, 1977). Des

sa forma algumas generalizações podem ser feitas para os concentrados protéicos de folhas. Segundo AKESON & STAHMANN (1965) esses concentrados contêm mais lisina que o cereal mais rico neste aminoácido, mais metionina que a soja e podem ser comparados favoravelmente a proteínas de origem animal.

Segundo PARRISH et alii (1974) dois critérios são normalmente usados na avaliação do perfil de aminoácidos de uma proteína: a relação entre o teor de um aminoácido e os aminoácidos essenciais (A/E), e a relação entre os aminoácidos essenciais e o total de aminoácidos (E/T). A relação A/E das proteínas de folhas é comparável com a de outros alimentos, exceto por uma deficiência de metionina, que pode ser sanada pela fortificação com metionina suplementar. A relação E/T é bastante similar à encontrada para o leite e o teor de aminoácidos essenciais das proteínas de folhas é bastante elevado.

Na Tabela 8 são apresentadas as composições dos concentrados integral e "branco", segundo BICKOFF et alii (1975). Pela observação desta tabela nota-se que os aminoácidos sulfurados, lisina, treonina e triptofano, que são os aminoácidos normalmente deficientes nas dietas, estão presentes em maiores teores no concentrado "branco" que no integral. Este fato deve-se, parcialmente, à adição de metabissulfito de sódio normalmente usado na preparação do concentrado "branco", que tem o efeito de aumentar a concentração dos aminoácidos sulfurados pela diminuição de sua oxidação durante o processo.

Uma vez que esses aminoácidos são os limitantes, o coeficiente de eficácia protéica (CEP) do concentrado "branco" é aumentado pelo uso do metabissulfito de sódio.

Tabela 8. Aminoácidos de concentrados protéicos de alfafa.

Aminoácidos	Concentração em g/100g de proteína	
	Concentrado integral	Concentrado "branco"
Fenilalanina + tirosina	10,36	11,99
Isoleucina	5,24	5,28
Leucina	8,92	9,42
Lisina	6,31	6,43
Metionina + cistina	3,27	4,33
Treonina	5,01	5,70
Triptofano	1,65	2,45
Valina	6,41	6,91
Ácido aspártico	10,44	10,04
Ácido glutâmico	11,18	12,02
Alanina	6,07	6,35
(Amônia)	1,61	1,07
Arginina	6,17	7,98
Glicina	5,21	5,52
Histidina	2,45	3,19
Prolina	4,69	4,44
Serina	4,42	3,65

Fonte: BICKOFF *et alii* (1975).

Segundo DONNELLY *et alii* (1983) a fração citoplasmática contém mais lisina e histidina que a fração cloro-plástica, tendo sido atribuído a este fato as diferenças obser

vadas entre os concentrados "branco" e "verde", o que também explica as diferenças de composição entre concentrados protéicos de folhas de diferentes plantas, uma vez que as espécies diferem entre si com relação as proporções entre as proteínas das frações citoplasmática e cloroplástica.

BICKOFF *et alii* (1975) observaram que os concentrados protéicos "brancos" contêm teores mais baixos de leucina, glicina, serina, isoleucina e fenilalanina e teores muito mais elevados de histidina, lisina, arginina, treonina, ácido glutâmico, cistina e tirosina. Os dados obtidos pelos autores mostram que os aminoácidos sulfurados e a lisina são limitantes nos concentrados integrais, nos concentrados "brancos" e nos concentrados "verdes", embora a qualidade do concentrado "branco" seja melhor.

O perfil de aminoácidos fornece uma boa indicação da qualidade de uma proteína, KIES (1981) aponta a biodisponibilidade dos aminoácidos como o segundo parâmetro a ser considerado. Segundo o autor, a intensidade em que os aminoácidos de uma proteína estão disponíveis para serem utilizados é determinada por fatores como configuração da proteína, ligações entre os aminoácidos, outros constituintes da dieta e condições fisiológicas do trato gastrointestinal do indivíduo envolvido. Desta forma, a biodisponibilidade é provavelmente, embora não exclusivamente, uma função da digestibilidade da proteína. Estudos "in vitro" envolvendo hidrólise enzimica

das proteínas através do uso de pepsina e combinação pepsina/pancreatina tem fornecido bons resultados a respeito da qualidade protéica.

MALIWAL (1983) analisou o perfil de aminoácidos de concentrados protéicos de folhas tendo usado a hidrólise enzimica. Os resultados encontrados não são comparáveis às informações disponíveis na literatura, todas baseadas na hidrólise ácida das proteínas. Durante o processamento ocorre, em maior ou menor grau, reações entre proteínas e polifenóis e entre açúcares e proteínas, envolvendo principalmente metionina, lisina, cisteína, histidina, triptofano e arginina, o decréscimo na disponibilidade desses aminoácidos afeta sobremaneira a digestibilidade e o valor nutricional das proteínas. Uma vez que as ligações entre polifenóis e proteínas e açúcares e proteínas são susceptíveis à hidrólise ácida e resistentes à hidrólise enzimica, os resultados obtidos pelo emprego da última refletem de forma mais realista o valor nutricional da proteína. O experimento desenvolvido pelo autor mostra que a digestibilidade "in vitro" determinada por digestão com pepsina e pancreatina, a biodisponibilidade de lisina e o teor de aminoácidos sulfurados são meios adequados para a avaliação da qualidade nutricional dos concentrados protéicos de folhas, embora não permitam detectar a presença de "flavor" e de componentes tóxicos.

BICKOFF *et alii* (1975) consideram que somente o perfil de aminoácidos e digestibilidade "in vitro", testes nor

malmente usados na avaliação de proteínas, não são suficientes para a avaliação de proteínas de fontes novas. Há a necessidade de se efetuar ensaios biológicos, mesmo que essas proteínas sejam provenientes de matérias-primas normalmente consumidas pelo homem ou por animais, pois existe a possibilidade da presença de componentes tóxicos ou inibidores de crescimento, causada pelo processamento ou pela concentração de toxinas originalmente presentes em baixos teores. Esses pesquisadores avaliaram a qualidade nutricional de concentrados "brancos" de alfafa e encontraram digestibilidade "in vitro" de 97 a 99%, e cômputo químico igual a 100, baseado no padrão da FAO, o que indica que esse concentrado é um alimento de alta qualidade nutricional.

SUBBA RAU et alii (1972) testaram a qualidade de proteínas de folhas de dezenove diferentes espécies através de ensaio biológico. Ao fim do experimento, com base nos valores de PER (Protein efficiency ratio) ou coeficiente de eficácia protéica, CEP, obtidos, as plantas foram classificadas em quatro categorias, sendo cinco sem valor nutricional, causando perda de peso ou ganho desprezível; seis de má qualidade, induzindo a um ganho de peso menor que 15 g, com PER menor que 1,0; três com qualidade intermediária, levando a um ganho de peso de 20 a 35 g, com PER entre 1,30 e 1,75; cinco de boa qualidade, levando a um ganho de peso maior que 40 g com PER maiores que 1,75. Os valores de PER obtidos pelos autores são apresentados na Tabela 9, a seguir.

Tabela 9. Crescimento e coeficiente de eficácia protéica em proteínas de folhas.

Fonte de proteínas na ração	Proteína na ração (%)	Consumo de ração (g)	Ganho de peso (g)	C.E.P.
<i>Medicago sativa</i>	11,1	181	35,6	1,75
<i>Tecoma stans</i>	10,9	85	-10,4	-
<i>Amaranthus</i> sp.	11,7	153	26,1	1,45
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>calourapa</i>	11,3	201	43,9	1,86
<i>Raphanus sativus</i>	11,6	213	46,9	1,89
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	11,5	232	46,8	1,75
<i>Dolichos lablab</i>	10,9	87	0,7	0,07
<i>Arachis hypogaea</i>	11,0	102	6,6	0,59
<i>Phaseolus vulgaris</i>	10,8	128	11,6	0,84
<i>Solanum tuberosum</i>	11,1	133	20,4	1,38
<i>Sesbania speciosa</i>	10,4	Não	houve	consumo
<i>Daucus carota</i>	10,2	116	-2,4	-
<i>Dolichos biflorus</i>	10,8	116	3,3	0,26
<i>Phaseolus trilobus</i>	11,1	126	8,4	0,59
<i>Sesbania cannabina</i>	11,0	113	11,0	0,89
<i>Beta vulgaris</i>	11,1	138	13,1	0,86
<i>Brassica rapa</i>	11,2	205	43,8	1,90
<i>Brassica oleraceae</i> var. <i>botrytis</i>	11,6	223	49,5	1,91
Soro de leite em pó	10,9	231	71,2	2,82

Fonte: SUBBA RAU et alii (1972).

SGARBIERI (1976) apresenta uma compilação dos valores de coeficiente de eficácia protéica obtidos na literatura, são os seguintes:

Tabela 10. Qualidade da proteína de diferentes concentrados protéicos de folhas.

Fonte de CPF (Conc. protéicos de folhas)	C.E.P. (corrigido-caseína 2,5)	Referência
Alfafa (Processo Pirie)	0,92 - 1,28; 2,20*	N.W. PIRIE (1971)
Alfafa (Processo Pirie)	1,29 - 1,75 (não corrigido)	B.H. SUBBA RAO et alii (1972)
CPF de trigo (Processo Pro Xan)	1,60	O.L. OKE (1974)
Alfafa (Processo Pirie)	1,15 - 2,38*	R.O. MYER & P.R. CHEEK (1975)
Alfafa (Processo Pro Xan)	1,41 - 1,81; 2,97*	E.M. BICKOFF et alii (1975)
Alfafa (Pro Xan II)	1,67 - 1,83	
Alfafa (WELPRO)	2,13 - 2,27 (0 ppm SO ₂)	E.M. BICKOFF et alii (1975)
WELPRO	2,30 - 2,56 (200 ppm SO ₂)	
WELPRO	2,54 - 2,84 (1000 ppm SO ₂)	
Alfafa (WELPRO)	2,68 - 3,13	A.J. CLIFFORD et alii (1975)
Alfafa (Fração cloroplástica)	0,39 - 2,21	

* Suplementação com os aminoácidos metionina e lisina, ou com ambos.

Fonte: SGARBIERI (1976)

Embora os métodos biológicos sejam considerados de valor definitivo para a avaliação da qualidade nutricional de proteínas, estes são caros e demorados, requerendo consideráveis quantidades de amostras que nem sempre estão disponíveis. Por esta razão muitos pesquisadores têm testado métodos químicos e microbiológicos na avaliação de proteínas de concentrados protéicos de folhas, visando comparar os resultados obtidos pelos mesmos e por ensaios biológicos a fim de detectar a adequação dos métodos em questão na avaliação da qualidade dos concentrados protéicos de folhas.

HENRY & FORD (1965) testaram um método microbiológico para a avaliação de concentrados protéicos de folhas e observaram que os resultados encontrados foram semelhantes aos fornecidos por ensaios biológicos feitos com ratos. Segundo estas análises, os concentrados de folhas apresentam qualidade nutricional comparável à de semente de leguminosas e grãos de cereais.

2.4.3. Fatores que afetam a qualidade nutricional dos concentrados protéicos de folhas

Como já foi visto em 2.4.2, o valor nutricional das proteínas é provavelmente mais limitado pela sua digestibilidade (relacionado à disponibilidade dos aminoácidos) do que pelos teores de aminoácidos. Segundo PARRISH et alii (1974) existem vários fatores que diminuem a digestibilidade das pro-

teínas de folhas: (1) certas organelas das células podem atuar sobre as proteínas durante a extração reduzindo a digestibilidade das mesmas pelas enzimas; (2) taninos podem complexar com proteínas e desta forma reduzir a digestibilidade pela tripsina; (3) há a possibilidade de redução do teor ou da disponibilidade metabólica de um ou mais aminoácidos críticos, por exemplo, o aquecimento acima de 100°C tem efeito deletéreo sobre a proteína podendo tornar a lisina completamente indisponível; (4) a não destruição, inativação ou remoção de substâncias nocivas naturalmente presentes no material, como antimetabólicos, pode reduzir a digestibilidade, essas toxinas normalmente podem ser removidas por intensa lavagem e aquecimento do material; (5) contaminação do concentrado por substâncias tóxicas estranhas durante o processamento também pode causar problemas digestivos e; (6) substâncias deletéreas podem se formar durante o armazenamento.

HENRY & FORD (1965) enfatizam a importância do estágio de maturidade das folhas. Com a maturidade, a extratibilidade das proteínas diminui, sendo a fração cloroplástica mais afetada que a citoplasmática, dessa forma, a proteína extraída de folhas mais velhas tende a conter maiores proporções de proteína citoplasmática, que possui valor biológico e digestibilidade mais elevados, em consequência os concentrados protéicos preparados a partir de folhas mais velhas apresentam melhor qualidade nutricional. Segundo os autores, este fato explica parte das diferenças observadas entre concentra-

dos protéicos de diferentes espécies, pois as plantas utilizadas estão em diferentes estágios de maturidade.

BICKOFF *et alii* (1976) observam que tanto o coeficiente de eficácia protéica como a digestibilidade dos concentrados protéicos são afetados pelo processamento. O uso de agentes redutores, o emprego do calor para coagular as proteínas, o emprego de ácidos diluídos para lavar e remover componentes deletéreos e os métodos de secagem são fatores que exercem considerável influência sobre a qualidade dos concentrados de folhas.

PARRISH *et alii* (1974) consideram que um procesamento adequado e o uso de antioxidantes como o ácido ascórbico ou BHA (Hidroxí-anizol butilado) podem contribuir para o controle dos fatores que afetam a qualidade nutricional dos concentrados protéicos de folhas.

A adição de agentes redutores como o metabissulfito, como foi visto em 2.4.2, contribui para melhorar a qualidade nutricional dos concentrados, por diminuir a oxidação dos aminoácidos sulfurados durante o processamento (FIORENTINI & GALOPPINI, 1983).

DONNELLY & RETTRAY (1983) observam que a disponibilidade média de metionina mais cistina (em equivalentes de metionina) em proteínas de diferentes espécies foi aumentada de 60 para 80% com o tratamento com metabissulfito de sódio durante o processamento. Os autores observam que embora o efei-

to do metabissulfito de sódio na disponibilidade da metionina tenha sido pequeno, seu efeito na disponibilidade da cistina foi muito grande, elevando a disponibilidade de 27% para 73%, o que confirma a suposição de que as quinonas ligam-se preferencialmente à cistina do que à metionina.

Segundo BUCHANAN (1969a) o perfil de aminoácidos e os ensaios microbiológicos para a avaliação da disponibilidade de aminoácidos sugerem que a metionina, ou os aminoácidos sulfurados totais são limitantes em proteínas de folhas frescas. Entretanto, durante o aquecimento a redução na disponibilidade de lisina é maior do que a de metionina, dessa forma, após o aquecimento a lisina pode tornar-se o aminoácido limitante.

BUCHANAN (1969b) analisou os efeitos do armazenamento e da extração de lipídeos nas propriedades das proteínas de folhas. Os resultados demonstraram que a temperaturas mais baixas (4 a 28°C) ocorre intensa oxidação dos lipídeos, levando à formação de complexos lipídeo-proteína, porém com pequeno reflexo na digestibilidade da proteína. Foi observado que o aquecimento a 100°C acarreta redução na digestibilidade, o que pode ser atribuído a dois fatores: reações na fase lipídica dependentes, do teor de umidade, mas não da presença de O₂ e modificações nas proteínas que dependem principalmente da redução do aquecimento, não são influenciadas pela presença de lipídeos, não são afetadas pela extração com solventes e não ocorrem em proteínas competamente secas. Os resultados obtidos demons-

tram que a redução da digestibilidade das proteínas pode ser atribuída mais aos danos causados pelo calor às proteínas, em especial em presença de umidade, do que à oxidação de lipídeos e conseqüente formação de complexos lipídeos-proteínas.

A drástica redução na digestibilidade da proteína causada pelo aquecimento a 100°C também foi observada por HENRY & FORD (1965).

COWLISHAW *et alii* (1956) avaliaram a influência de diferentes métodos de processamento no valor nutritivo de concentrados protéicos de folhas. Segundo esses autores uma lavagem com água quente aumentou o valor biológico de alguns concentrados pela remoção de substâncias tóxicas solúveis em água.

Segundo SUBBA RAU *et alii* (1972) altos teores de cinza e de sólidos solúveis diminuem a qualidade de preparações de proteínas de folhas. Altos teores de cinza podem se dever a contaminações com solo ou serem devidos a peculiaridades do material usado. Altos teores de sólidos solúveis podem ocorrer devido, principalmente, a lavagem ineficiente ou a prensagem inadequada do material coagulado no processamento. A superioridade dos concentrados citoplasmáticos sobre os cloroplásticos em termos de qualidade pode ser atribuída em grande parte aos teores de N mais elevados e teores de cinza menores. A pré-lavagem do material leva a uma redução no teor de cinza, pela remoção de materiais minerais contaminantes, melhorando a

qualidade nutricional, da mesma forma, uma lavagem com ácido a quente do coágulo protéico melhora a qualidade nutricional pela remoção de minerais solúveis em ácido. Foi observado pelos autores que a relação fenóis/N influencia inversamente a qualidade.

Outro fator importante a ser considerado na avaliação nutricional de concentrados protéicos de folhas é a interferência da aceitabilidade dos concentrados durante ensaios biológicos. SUBBA RAU et alii (1972) consideram que as grandes variações observadas na qualidade das proteínas de folhas são consequência de fatores que afetam principalmente a aceitabilidade e a digestibilidade. Os fatores que afetam a aceitabilidade estão relacionados à presença de "flavor" indesejável e impurezas que não estão totalmente conhecidas. Os autores concluem que a qualidade dos concentrados protéicos de folhas ingeridos, ou seja, excluindo-se a influência da aceitabilidade, está diretamente relacionada aos teores N e S e inversamente relacionada aos teores de cinza, sólidos solúveis e fenóis. La vagens adequadas para a remoção de contaminantes e substâncias solúveis indesejáveis levam a uma melhor qualidade nutricional.

2.4.4. Os concentrados protéicos de folhas na alimentação animal e humana

Para HENRY & FORD (1965) o valor dos concentrados protéicos de folhas na alimentação animal, como suplemento de dietas a base de cereais, portanto com baixos teores de li-

sina, já foi estabelecido através de experimentos realizados com aves, ratos e suínos e sua utilização na alimentação humana tem sido estudada.

Segundo PARRISH et alii (1974) o primeiro experimento a respeito do uso de concentrados protéicos de folhas na alimentação animal foi publicado em 1960. Concentrado protéico de folhas foi testado na alimentação de suínos e de aves tendo sido observados bons resultados.

SGARBIERI (1976) enfatiza o papel dos pigmentos (clorofila e xantofila) presentes nos concentrados integrais e nos concentrados de frações "verdes" (Pro Xan II) na alimentação de aves, pois estes proporcionam a pigmentação desejada na pele e nos ovos.

Concentrados protéicos integrais não são normalmente aceitos para consumo humano devido ao seu "flavor" e coloração característicos. A aceitação destes produtos só é possível, segundo KOHLER & KNUCKLES (1977), em um dos seguintes casos: (1) em períodos de intenso "stress" e fome, como no caso de guerras; (2) quando o material é incorporado a alimentos fortemente flavorizados e coloridos, capazes de mascarar seu "flavor" e coloração; e (3) em áreas de deficiência protéica os concentrados protéicos de folhas podem ser fornecidos a crianças que ainda não são capazes de escolher seu próprio alimento. Na última categoria, os autores citam vários trabalhos desenvolvidos. Na Nigéria, ciranças foram recuperadas e "kawashior-

kor" pelo consumo de 10g/dia de concentrado protéico de folhas. Estudos na Índia mostraram que concentrados protéicos integrais de folhas incorporados a balas e produtos similares foram bem aceitos por crianças na faixa de três a quatro anos, as crianças que receberam suplementação com concentrados de folhas apresentaram maior ganho de peso e altura do que as crianças do grupo controle.

— PARRISH *et alii* (1974) relataram um estudo envolvendo crianças recuperadas de desnutrição na Jamaica. Houve ganho de peso em crianças que receberam dieta contendo proteína de folhas de alfafa e de leite similar ao de crianças que receberam somente leite. Os mesmos autores afirmam que os concentrados protéicos de folhas podem ser comparados a proteínas de leveduras, soja, e sementes de algodão e girassol.

— Conforme já foi visto, os problemas de aceitabilidade dos concentrados integrais levaram ao desenvolvimento de técnicas para a produção de concentrados "brancos". Estes concentrados, por suas características e composição, podem ser usados tanto para elevar o teor protéico de alimentos pobres em proteínas como para melhorar o valor nutricional das proteínas presentes.

— CARLSON & HANCZAKOWSKI (1985) avaliaram a qualidade nutricional de misturas de concentrados protéicos de folhas e proteínas alimentares. Os resultados mostraram que o valor biológico de misturas de proteínas sempre foi mais eleva

do que o de cada componente individualmente. Este fato não po de ser explicado somente pela complementação de aminoácidos, pois a adição de concentrado de folhas melhorou o valor biol^ogico tanto de proteínas pobres em lisina, como o glúten, como o de proteínas com altos teores de lisina e aminoácidos sulfu-
rados como o soro de leite, o que seria explicado, provavelmente, por outros fatores que afetam a utilização das proteínas.

FIORENTINI & GALOPPINI (1983) relataram o uso de 3 a 10% de concentrados protéicos integrais incorporados a uma grande gama de produtos como sopas, molhos, linguiças e biscoitos. Segundo os autores, concentrados citoplasmáticos tem sido incorporados a biscoitos e sopas vegetais, sendo que a aceitação dos produtos foi boa com a adição de 3% em biscoi-
tos e 15% em sopas vegetais.

2.5. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE CONCENTRADOS PROTÉICOS DE FOLHAS

Segundo KINSELLA (1976) propriedade funcional de uma proteína refere-se às características físico- químicas que afetam o processamento e o comportamento da proteína num sistema alimentar, o que é reflexo de complexas interações entre a composição, estrutura, conformação e propriedades físico-químicas da proteína em si e de outros componentes do alimento além de interações entre eles.

As propriedades funcionais determinam as possi-

bilidades de aplicação de uma proteína. Quando uma nova proteína é usada em substituição a uma proteína convencional deve manter ou melhorar a qualidade e a aceitabilidade do alimento no qual é adicionada, o que mostra a grande importância das propriedades funcionais, pois, segundo KINSELLA (1976), de nada adianta produzir um alimento de alto valor nutricional se este não for aceito para o consumo.

KINSELLA (1976) observa também que as propriedades funcionais variam com a fonte de proteína, com o método de isolamento, precipitação e secagem ou desidratação, com a concentração, modificações químicas sofridas pela proteína e com fatores do meio como pH, temperatura e força iônica.

Segundo o mesmo autor, uma determinação sistemática das propriedades funcionais deve ser feita sempre que se desenvolve nova fonte de proteína, pois desta maneira, é possível avaliar sua potencialidade.

Segundo FIORENTINI & GALOPPINI (1983) as propriedades funcionais desempenham importante papel na determinação das possibilidades de utilização dos concentrados protéicos de folhas para o consumo humano. Os concentrados em geral, e os concentrados de fração citoplasmática em especial, quando corretamente isolados, revelam boas propriedades funcionais, especialmente as relacionadas à capacidade de absorção de água e óleo, o que confere aos concentrados protéicos de folhas boas características para utilização em produtos cárneos tipo emulsão.

2.5.1. Solubilidade

Muitas das propriedades funcionais de proteínas em alimentos estão relacionadas às interações entre a proteína e a água. Através do conhecimento da solubilidade de uma proteína pode-se prever seu potencial e suas limitações de aplicações em sistemas alimentares, além de fornecer informações úteis para a otimização do processamento e para a determinação dos efeitos dos tratamentos térmicos, pois, segundo KINSELLA (1976) o perfil de solubilidade do nitrogênio sob diferentes condições de pH é um ótimo guia de funcionalidade da proteína, pois relaciona-se diretamente com outras propriedades importantes.

Segundo KINSELLA (1976) a solubilidade é bastante dependente dos tratamentos prévios sofridos pela proteína, do método de extração, dos íons e do pH do solvente.

KOHLER & KNUCKLES (1977) estudaram a solubilidade de concentrados protéicos de folhas de alfafa, fração citoplasmática, e observaram que os concentrados coagulados pelo calor mostraram-se praticamente insolúveis entre pH 2 e pH 10, enquanto que os concentrados precipitados pela ação de ácidos mostraram-se solúveis em condições ácida e alcalina, com uma faixa de baixa solubilidade entre pH 3 e 8, conforme pode ser visto na Figura 2, a seguir.

Figura 2. Solubilidade de N em concentrado protéico de alfafa.

Fonte: KOHLER & KNUCKLES (1977).

KOHLER & KNUCKLES (1977) observaram também que a solubilidade dos concentrados coagulados pela ação do calor é aumentada quando a temperatura é reduzida para valores próximos de 0°C, a pH 7.

WANG & KINSELLA (1976) observaram que todas as amostras de concentrados protéicos de folhas de alfafa estudados mostraram solubilidade mínima entre pH 3 e 4. Os autores observaram que o uso de diferentes extratores, bem como a adição de NaCl em concentrações entre 0,05 e 0,2M não influenciou a solubilidade.

Para LU & KINSELLA (1972) a solubilidade dos concentrados protéicos de folhas de alfafa é afetada pela concentração do produto e pela temperatura. Foi observado que a temperatura de 80°C a solubilidade tende a ser levemente maior para concentrações de 5% do que para 10%. Entretanto, concentrações de 10% fornecem maiores solubilidades a valores de pH menores que 3 e maiores que 6. A 25°C as curvas de solubilidade nas concentrações de 5 e 10% são bastantes semelhantes. Os resultados obtidos indicaram ainda que os concentrados protéicos de folhas são mais solúveis a pH mais elevados.

Segundo FIORENTINI & GALOPPINI (1981) para concentrados citoplasmáticos coagulados por acidificação cerca de 90% do N apresenta-se solúvel em condições alcalinas (pH 10) enquanto que a pH 2, somente 40% do N está solúvel. O fato dos concentrados citoplasmáticos coagulados pelo calor mostrarem solubilidade menor que 10% mostra que os concentrados protéicos obtidos por este processo são muito mais desnaturados.

KNUCKLES & KOHLER (1982) observaram que o calor úmido reduz a solubilidade das proteínas de folhas, o que reflete a importância da técnica de secagem usada para a obtenção dos concentrados protéicos.

2.5.2. Capacidade de absorção de água e óleo

A capacidade de absorção e retenção das proteínas refere-se à habilidade de reter ingredientes em estado sólido

lido, semi-sólido ou líquido. Segundo KINSELLA (1976) em alguns casos esta propriedade implica na prevenção ou retardamento da perda de componentes voláteis como a água e substâncias flavorizantes. Esta propriedade é fortemente influenciada pelo pH e força iônica que afetam as características superficiais e a área superficial das moléculas protéicas, pela presença de carboidratos e lipídeos, grau de umulsificação da gordura, tamanho das partículas protéicas, intensidade de agitação, modificações químicas ou enzimáticas e tratamento térmico.

Segundo KNUCKLES & KOHLER (1982) a capacidade de retenção de óleo de concentrados protéicos de folhas de alfafa é maior que a de isolado protéico de soja. Concentrados protéicos que sofreram durante a secagem aquecimento a temperaturas superiores a 85°C mostraram capacidade de retenção de água nula, enquanto que os concentrados que foram secos pelo sistema "spray dried" a 140°C mostraram capacidade de retenção de água 30% menor que a de isolado protéico de soja, isto ocorre devido ao fato de que altas solubilidades determinam menor capacidade de aprisionar água.

WANG & KINSELLA (1976) observaram que o uso de extratores para a solubilização das proteínas durante o processamento conduzem à obtenção de concentrados protéicos de folhas com capacidade de absorção de água mais elevada (foram testados água, NaCl, NaOH e "tris buffer"). A remoção dos lipídeos pela extração com acetona reduz a capacidade de absorção

de água dos concentrados. Com relação à capacidade de retenção de óleo, os autores relataram que os concentrados extraídos com água e NaOH absorvem mais óleo do que os extraídos com NaCl e "tris buffer". O tratamento do concentrado com acetona reduz a absorção de óleo.

FIorentini & Galoppini (1981) relataram para concentrado protéico de folhas de alfafa, capacidade de retenção de água de 4,5 ml de água/g de concentrado. A capacidade de retenção de óleo do mesmo concentrado foi de 4,1 ml de óleo/g de concentrado, que é mais alta que a de concentrados isolados protéicos de soja.

2.5.3. Capacidade de formar emulsão

Segundo KINSELLA (1976) esta propriedade está relacionada à capacidade das proteínas de diminuir a tensão interfacial entre os componentes hidrofóbicos e hidrofílicos nos alimentos e esta função reflete a composição e a conformação da proteína.

Para o mesmo autor a capacidade de emulsificação é definida como o volume de óleo que pode ser emulsionado por um grama de proteína antes que ocorra o colapso da emulsão. Tanto a capacidade de emulsificação como a estabilidade da emulsão formada por proteínas são afetadas por vários fatores e condições, entre eles; tipo de equipamento utilizado nas determinações, velocidade de homogeneização, velocidade de adição de óleo, temperatura, pH, fonte da proteína, solubilidade

e concentração da proteína, tipo de óleo usado, tipo de concentração de sal, presença de açúcares e teor de umidade.

Segundo FIORENTINI & GALOPPINI (1981) as propriedades de emulsificação, que são úteis em vários sistemas em que proteínas são misturadas com lipídeos e água, são bastante afetadas pelo pH. Os valores máximos de atividade emulsificante e estabilidade da emulsão para concentrado citoplasmático de folhas de alfafa ocorreram a pH 6. A estabilidade da emulsão é mais ou menos constante entre pH 4 e 10 e é praticamente nula em condições mais ácidas. A adição de NaCl reduz levemente tanto a atividade de emulsificação como a estabilidade da emulsão, enquanto que a sacarose aumenta a atividade emulsificante.

Para KNUCKLES & KOHLER (1982) a atividade de emulsificação e a estabilidade da emulsão de concentrados protéicos de folhas de alfafa são semelhantes às de isolados protéicos de soja. Os autores observaram que a capacidade de formar emulsão de concentrados protéicos de folhas de alfafa cresce com o aumento na concentração. Emulsões formadas com soluções de concentrados protéicos de folhas de alfafa na concentração de 2% em óleo tem alta viscosidade e são muito estáveis.

WANG & KINSELLA (1976) observaram que o uso de diferentes extratores para a solubilização das proteínas durante o processamento exerceu pequena influência na atividade de emulsificação, enquanto que o tratamento com acetona reduz es-

ta propriedade. Segundo os autores, a atividade emulsificante de todas as amostras de concentrados protéicos de folhas de alfafa testadas foi maior que a dos isolados de proteínas de soja usados como padrão. Foi observado que os concentrados de folhas têm boas propriedades de formar emulsão especialmente nas proximidades de seu ponto isoelétrico.

2.5.4. Formação de gel

Segundo KINSELLA (1976) a capacidade de formar gel sob determinadas condições é uma importante propriedade funcional de várias proteínas. Géis protéicos são compostos de matrizes tridimensionais ou redes entrelaçadas de polipeptídeos nas quais a água, o "flavor", os açúcares e outros componentes são retidos. A formação de gel protéico normalmente requer aquecimento prévio da proteína para causar desnaturação parcial.

KNUCKLES & KOHLER (1982) trabalhado com concentrados de folhas de alfafa encontraram melhores propriedades geleificantes do que as de isolados protéicos de soja e melhores que as relatadas na literatura, pois os concentrados protéicos coagulados pela ação de ácidos sempre foram considerados como possuidores de baixas propriedades para formar gel; segundo os autores a capacidade dos concentrados protéicos de folhas de formar gel é muito afetada pela temperatura e método de secagem empregado na sua obtenção e pelas condições nas quais o gel é formado.

Segundo LU & KINSELLA (1972) a capacidade de formar gel dos concentrados protéicos de folhas é influenciada por sua concentração e pela concentração de cloreto de cálcio. Os melhores resultados foram obtidos com concentração de 10% em peso, sendo que a formação de gel não ocorreu com concentrações de 5% ou menores. A concentração de CaCl_2 ótima a pH 12 é de 2% para 10% de concentrado; o gel formado nestas condições é relativamente estável. O pH e a temperatura também afetam a formação de gel. Os autores só observaram a formação de gel a pH 12 e mediante aquecimento a 80°C.

2.5.5. Formação de espuma

Segundo KINSELLA (1976) a capacidade de formar espuma por incorporação de ar é uma propriedade funcional muito importante de proteínas em vários alimentos. Espuma em alimentos, geralmente, consiste de "gotículas" de ar dispersas e encapsuladas por um líquido que contém um agente surfactante. O agente surfactante diminui a tensão superficial do líquido, facilitando a sua deformação e a grande expansão observada em sua área superficial, diminui também a tensão interfacial.

O mesmo autor observa que proteínas com propriedade ideal de formar espuma apresentam a capacidade de formar membranas circundando as "gotículas" de ar e sofrer um certo grau de desnaturação, e em alguns casos específicos coagulam mediante aquecimento preservando a estrutura da espuma.

KINSELLA (1976) observa que vários fatores in-

fluenciam as propriedades de formar espuma, entre eles: fonte da proteína, método de preparação, composição, solubilidade, concentração, pH, temperatura e duração do período de aquecimento, presença de sais, açúcares, lipídeos e método de determinação desta propriedade. A propriedade de formar espuma de uma proteína é determinada geralmente pelo máximo aumento de volume que uma dispersão protéica apresenta após incorporação de ar por batedura, agitação ou aeração.

KNUCKLES & KOHLER (1982) observaram que concentrados protéicos de folhas de alfafa apresentam boas propriedades de formação de espuma, o que é útil para a aeração de sistemas alimentares. A agitação de solução de concentrado de alfafa produz espuma com 10 vezes o volume inicial da solução, este aumento de volume é semelhante ao obtido com a clara de ovo. A espuma obtida mostrou-se mais estável após 2 horas que a espuma de clara de ovo. O volume e a estabilidade da espuma de concentrado de alfafa sofrem influência do pH. O volume é reduzido em valores de pH acima de 6 e uma maior estabilidade é conseguida a pH próximo de 4,5. A espuma obtida mostrou-se estável ao aquecimento, mas levemente diferente na aparência em relação à espuma de clara de ovo. Os dados obtidos pelos autores sugerem que os concentrados protéicos de folhas de alfafa, fração citoplasmática, podem ser usados como substitutos parciais de albumina de ovo na preparação de merengues.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Matéria-prima

As plantas de aguapê (*Eichhornia crassipes*) utilizadas foram obtidas no CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba), provenientes do projeto de despoluição desenvolvido por esta instituição de pesquisa.

3.1.2. Concentrado protéico de aguapê

O concentrado protéico de aguapê, CPA, analisado foi obtido conforme o descrito em métodos, item 3.2.1.2.4.

3.1.3. Animais

No ensaio biológico foram utilizados ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus* variedade *albinus*) procedentes do biotério do Setor de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados dezoito animais divididos em três grupos.

3.1.4. Rações

As rações foram preparadas conforme AOAC(1975), com a seguinte composição:

- ração contendo o CPA como única fonte proteíca, com 37,2% de CPA, 8% de óleo de soja, 4% de mistura salina, 1% de mistura vitamínica, 10% de sacarose, 1% de fibra e 38,8% de amido.
- ração controle, com caseína como fonte proteíca, contendo: 12,5% de caseína, 63,5% de amido, 8% de óleo de soja, 4% de mistura salina, 1% de mistura vitamínica, 10% de sacarose e 1% de fibra.
- ração aprotéica, contendo: 76% de amido, 8% de óleo de soja, 4% de mistura salina, 1% de mistura vitamínica, 10% de sacarose e 1% de fibra.

3.1.5. Gaiolas

No ensaio biológico foram empregadas gaiolas individuais apropriadas que permitem o controle de consumo de rações e das fezes eliminadas pelos animais.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparação do concentrado protéico

3.2.1.1. Metodologia básica de obtenção

3.2.1.1.1. Lavagem e separação das raízes

O aguapê foi lavado em água corrente e suas raízes foram descartadas.

3.2.1.1.2. Desintegração

As folhas e pecíolos foram desintegrados em moe dor de martelos a 3250 rpm, com motor de 10 HP.

3.2.1.1.3. Extração das proteínas

O material desintegrado foi misturado com a so lução extratora na proporção de 3 partes do extrator para 1 parte de amostra desintegrada, à temperatura ambiente, por 30 min.

3.2.1.1.4. Centrifugação

A centrifugação foi feita em fluxo contínuo em centrífuga de cesto perfurada com tela de nylon 40 mesh e 600 rpm, sendo $g = 35$, com a separação do material em duas frações: suco verde e material fibroso (que foi descartado).

3.2.1.1.5. Precipitação das proteínas do suco

As proteínas contidas no suco verde foram precipitadas pela ação de agentes descritos em 3.2.1.2, tendo sido testada a eficiência daqueles diferentes agentes.

3.2.1.1.6. Separação do precipitado

O precipitado formado foi separado por decantação e o sobrenadante foi descartado.

3.2.1.1.7. Secagem

O precipitado protéico foi seco em estufa a 60°C com circulação de ar para a obtenção do concentrado na forma seca.

3.2.1.2. Determinação dos parâmetros mais adequados de processamento

3.2.1.2.1. Experimento 1

Com o objetivo de avaliar a eficiência dos diferentes extratores na solubilização das proteínas contidas no material desintegrado e conseqüente separação do material fibroso, testou-se dois extratores, conforme segue:

- a) extração com água, na proporção de 3 partes de água para 1 parte de material desintegrado, temperatura ambiente, por 30 min.

- b) extração com NaOH 0,05N, na proporção de 3 partes de NaOH 0,05N para 1 parte de material desintegrado, temperatura ambiente por 30 min.

Para avaliar a eficiência de cada extrator testado foram determinados os teores de proteína bruta na fração fibra, no suco verde após extração, bem como as quantidades obtidas de cada fração e porcentagem de proteína extraída em cada caso em relação à proteína presente no material antes da etapa extração.

As variáveis estudadas são mostradas no fluxograma 1.

Fluxograma 1. Variação na etapa de extração.

A₁: extração com água, conforme descrito em 3.2.1.2.1 a

A₂: extração com NaOH 0,05N, conforme descrito em 3.2.1.2.2 b

3.2.1.2.2. Experimento 2

Nesta etapa testou-se a influência do pH na precipitação das proteínas do suco, após extração com NaOH 0,05N, conforme descrito em 3.2.1.2.1.

A acidificação foi feita pela adição ao suco de HCl até que se atingisse os valores desejados de pH.

A avaliação da influência do pH foi feita pela determinação das quantidades de concentrado obtidas em cada tratamento.

Trabalhou-se com os seguintes valores de pH: 11,86 (sem adição de ácido); 9,90; 7,90; 6,60; 5,40; 3,50.

As variáveis estudadas são mostradas no fluxograma 2.

Fluxograma 2: Variação nos valores de pH na precipitação das proteínas.

B₁: pH 11,86 (sem adição de ácido)

B₂: com adição de HCl até pH 9,90

B₃: com adição de HCl até pH 7,90

B₄: com adição de HCl até pH 6,60

B₅: com adição de HCl até pH 5,40

B₆: com adição de HCl até pH 3,50

3.2.1.2.3. Experimento 3

Nesta etapa foi avaliado o efeito do aquecimento sobre a precipitação das proteínas do suco.

A precipitação foi feita sob as seguintes condições:

- a) por acidificação do suco pela adição de H_2SO_4 até pH 3,5 e aquecimento a $80^{\circ}C$, em banho-Maria.
- b) por acidificação do suco pela adição de H_2SO_4 até pH 3,5 sem aquecimento.

A avaliação do efeito do aquecimento foi feita pela análise da porcentagem de proteína do suco presente no precipitado formado.

As variáveis testadas são mostradas no fluxograma 3.

Fluxograma 3. Variação na temperatura na etapa de precipitação das proteínas.

C_1 : precipitação por acidificação a pH 3,5 e aquecimento a 80°C.

C_2 : precipitação por acidificação a pH 3,5, sem aquecimento.

3.2.1.2.4. Processamento final

Depois de estudadas as diferentes variáveis apresentadas nos experimentos 1, 2 e 3 descritos, foi elaborado o fluxograma 4 que define a metodologia mais adequada para a obtenção de Concentrado Protéico de Aguapé nas condições testadas.

As amostras utilizadas para as determinações químicas, avaliação da qualidade nutricional e de propriedades funcionais foram obtidos conforme descrito no Fluxograma 4 que está representado no item 4.2.4.

3.2.1.2.5. Redução do teor de cinza no concentrado seco

Depois de efetuados a análise química e o ensaio biológico do concentrado obtido conforme descrito em 3.2.1.2.4, foi testada a eficiência de uma ressuspensão e lavagem do concentrado já seco na redução do teor de cinza, conforme segue:

1,5 g do Concentrado Protéico de Aguapé seco foram dispersos em 75 ml de água com pH natural ou pH ajustado para 3,5 pela adição de HCl. As amostras foram submetidas à agitação eletromagnética por 30 min., seguida de centrifugação a 2.000 rpm por 20 min. e nova secagem em estufa a 60°C com circulação de ar.

Foram determinadas a porcentagem de redução nos

teores de cinza e a porcentagem de perda de proteína, através da determinação das quantidades de concentrado final obtidas em cada tratamento e das porcentagens de proteína no sobrenadante e de proteína e cinza no Concentrado final.

As variáveis testadas são mostradas no esquema abaixo:

D₁: lavagem com 50 partes de água com pH natural para 1 parte de Concentrado seco.

D₂: lavagem com 50 partes de água com pH ajustado em 3,5 para 1 parte de Concentrado seco.

3.2.2. Análises químicas

3.2.2.1. Umidade

Determinada pelo método gravimétrico, em estufa a 110°C até obtenção de peso constante, segundo AOAC(1975).

3.2.2.2. Proteína bruta

Determinada pelo método semi-micro-Kjeldahl, usando o fator de conversão 6,25, segundo AOAC (1975).

3.2.2.3. Proteína verdadeira

Adicionou-se a lg de amostra 10 ml de TCA 5%, após 1 h sob agitação, retirou-se alíquotas do sobrenadante para dosagem de proteína conforme descrito em 3.2.2.2, o teor de proteína verdadeira foi obtido por diferença.

3.2.2.4. Lipídeos

Determinados como lipídeos totais, pelo método gravimétrico usando extrator de Soxhlet, segundo AOAC (1975).

3.2.2.5. Cinza

Determinada pelo método gravimétrico, através de incineração da amostra a 550°C, segundo AOAC (1975).

3.2.2.6. Elementos minerais

As análises dos teores de elementos minerais foram feitas na Seção de Radioquímica e Química Analítica do CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo).

As amostras secas em estufa foram moídas (60 mesh). Após, procedeu-se à digestão sulfúrica para determinação de nitrogênio, e digestão nítrico-perclórica para os demais elementos, conforme recomendado por ZAGATTO *et alii* (1981).

As análises foram efetuadas como segue:

3.2.2.6.1. Nitrogênio: analisado por colorimetria em Auto Analyser Technican AAI.

3.2.2.6.2. Potássio e sódio: analisados por espectrometria de absorção atômica com chama ar-acetileno, em espectrômetro de absorção atômica Perkin-Elmer modelo 306.

3.2.2.6.3. Enxofre; analisado por turbidimetria em sistema de injeção em fluxo.

3.2.2.6.4. Fósforo, cálcio, manganês, ferro, cobre, magnésio, boro, alumínio, cloro, bário, chumbo, níquel, prata: zinco, cádmio, cromo, determinados por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido em argônio em espectrômetro JARREL-ASH, modelo Atom Comp 975.

3.2.2.7. Teor de aminoácidos

A determinação do teor de aminoácidos do concentrado protéico foi feita nos laboratórios do ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos, em Campinas), conforme metodologia a seguir:

Para a eliminação do excesso de cinza na amostra, a mesma foi hidratada conforme o seguinte procedimento: a 5g de amostra adicionou-se 40ml de TCA 20%, após agitação por 20 min., centrifugou-se o material por 10 min. a 5.000 rpm, lavou-se o precipitado com acetona em filtro cintizado G3, levou-se à estufa por 20 min. para a evaporação da

acetona. Para a hidrólise pesou-se o equivalente a 25mg de amostra em tubo de hidrólise, adicionou-se 10 ml de HCl 6N e a amostra foi hidrolisada a 110°C por 22 h. Recuperou-se o hidrolisado em solução tampão citrato, pH 2,2. Alíquotas de 75 µl foram aplicadas em colunas de troca iônica para separação de aminoácidos em analisador Technicon, segundo o método de SPACKMAN et alii (1958). Sendo o triptofano determinado colorimetricamente segundo OPIENSKA (1963).

3.2.2.8. Cômputo químico

A qualidade da proteína presente no concentrado de aguapê foi avaliada pelo cômputo químico em relação à caseína e à proteína padrão da FAO, conforme segue:

$$\text{cômputo químico} = \frac{\text{mg do AAE por g na proteína estudada} \times 100}{\text{mg do AAE por g na proteína padrão}}$$

onde: AAE = aminoácido essencial

Segundo PELLETT & YOUNG (1980)

3.2.3. Avaliação biológica

As análises para a avaliação biológica do concentrado foram efetuadas no Biotério do Setor de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.2.3.1. Ração

As rações preparadas conforme descrito em 3.1.4 foram avaliadas pela determinação do Coeficiente de Efi

cácia Alimentar (CEA) que é definido pelo aumento do peso do animal em razão da ração ingerida, ou seja:

$$CEA = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{ração ingerida (g)}}$$

segundo PELLETT & YOUNG (1980).

3.2.3.2. Proteína

A proteína do concentrado de aguapê foi avaliada através dos seguintes parâmetros:

3.2.3.2.1. Coeficiente de Eficácia Protéica (CEP)

O coeficiente de eficácia protéica, ou PER ("protein efficiency ratio") fornece indicações do aumento do peso do animal em função da proteína ingerida, conforme segue:

$$CEP = \frac{\text{ganho em peso (g)}}{\text{proteína ingerida (g)}}$$

segundo PELLETT & YOUNG (1980).

3.2.3.2.2. Coeficiente de digestibilidade (CD)

O coeficiente de digestibilidade reflete a relação entre o N, e portanto, a proteína, absorvida pelo organismo e o N, e portanto, a proteína ingerida, ou seja:

$$CD = \frac{NI - (NF - NF_0)}{NI}$$

onde: NI = N ingerido

NF = N determinado nas fezes

NF₀ = N fecal endógeno

Segundo PELLETT & YOUNG (1980).

3.2.3.2.3. Razão protéica líquida (RPL)

A razão protéica líquida, RPL, ou NPR ("net protein ratio") fornece indicações do aumento de peso do animal em função da proteína ingerida, levando em consideração também a perda de peso do grupo aprotéico, sendo definida pela relação:

$$RPL = \frac{\text{ganho de peso (g)} + \text{perda de peso do grupo aprotéico (g)}}{\text{proteína ingerida (g)}}$$

segundo PELLETT & YOUNG (1980).

3.2.4. Propriedades funcionais

Para a caracterização tecnológica do Concentrado Protéico de Aguapé, foram avaliadas a solubilidade, a dispersibilidade e a capacidade de absorção de água e óleo.

3.2.4.1. Solubilidade

A solubilidade do concentrado protéico de aguapé foi avaliada em função do pH. O método que foi usado é semelhante ao empregado por vários autores (LU & KINSELLA, 1972; BETSCHART & KINSELLA, 1973; WANG & KINSELLA, 1976; McWATTERS & HOLMES, 1979).

Foram dispersos 0,5g de concentrado em 50 ml de água destilada com pH ajustado de 2 a 12, com HCl ou NaOH diluídos. Após um período de 10 min. o pH foi reajustado, o material foi agitado em "shaker" por 30 min. a 150 rpm, após o que foi centrifugado por 30 min. a 2.200 rpm. Do sobrenadante foram re-

tiradas alíquotas para a determinação de N total pelo método de microKjeldahl conforme AOAC (1975). Os resultados são apresentados como porcentagem de proteína bruta nas diferentes condições de pH.

3.2.4.2. Dispersibilidade

A avaliação da dispersibilidade foi feita segundo TENUTA FILHO (1983). 0,5g da amostra foi homogeneizada em água (pH 7,0) sob agitação eletromagnética por 15 min. A dispersão formada foi deixada em repouso por 2 h, à temperatura ambiente. Foi retirada uma alíquota de 5ml da altura média da proveta, para determinação de proteína bruta, pelo método de microKjeldahl, segundo AOAC (1975).

3.2.4.3. Absorção de água

A maior parte dos métodos utilizados nessa determinação são adaptações da técnica desenvolvida por JANICKI & WALCZAK (1954). Na avaliação da capacidade de absorção de água do Concentrado de aguapé também foi usada uma adaptação do método citado.

Foram homogeneizados 0,5g de Concentrado em 5ml de água destilada, em tubo de centrífuga graduado, e deixada em repouso por 30 min., à temperatura ambiente, em seguida foi centrifugada. Após a centrifugação foi feita a leitura da água livre. A água retida após a centrifugação foi considerada como água absorvida e o resultado é expresso como ml de água/g de proteína, segundo TENUTA FILHO (1983).

3.2.4.4. Absorção de óleo

A determinação da capacidade de absorção de óleo é semelhante à da capacidade de absorção de água. 0,5 de Concentrado de aguapê foi homogeneizada em 5g de óleo de soja, em tubo de centrífuga graduado e deixado em repouso por 30 min., à temperatura ambiente, sendo então centrifugada. Após a centrifugação, foi feita a leitura do óleo livre e o resultado é apresentado como ml de óleo absorvido/g de proteína, segundo TENUTA FILHO (1983).

4. RESULTADOS

4.1. MATÉRIA-PRIMA

4.1.1. Composição química

Os resultados das análises de umidade, proteína bruta, lipídeos e cinza estão na Tabela 12.

Tabela 12. Composição química de aguapé (folhas + pecíolos)

Matéria seca (%)	Proteína bruta (%)a	Lipídeos (%)a	Carboidratos (%)a	Cinza (%)a
8,88	16,58	1,07	66,65	15,70

(a): porcentagem na matéria seca.

4.2. PARÂMETROS MAIS ADEQUADOS DE PROCESSAMENTO

4.2.1. Experimento 1

Os resultados obtidos para definir a eficiência dos extratores na solubilização das proteínas do material desintegrado e conseqüente separação do material fibroso são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. Avaliação da eficiência de H_2O e $NaOH$ 0,05N na extração das proteínas de aguapé.

Amostra	Massa ou Volume Obtidos	Proteína bruta (%)	Proteína na amostra (g)	% da Proteína inicial presente na amostra
Aguapé desintegrado	250g	1,16	2,90	100%
1. Extração com H_2O				
Fibra	83,31g	1,92	1,60	55,17
Suco	910 ml	0,105	0,96	33,10
2. Extração com $NaOH$ 0,05N				
Fibra	91,88g	1,42	1,30	44,99
Suco	900 ml	0,142	1,29	44,06

4.2.2. Experimento 2

Após testar as variáveis para definir a influência do pH na precipitação das proteínas do suco obteve-se os dados apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Influência do pH na precipitação das proteínas do suco.

pH	Massa de concentrado obtido (g) (para 250 ml de suco)	% em relação ao melhor resultado
11,86	0,2040	44,88
9,90	0,3150	69,31
7,90	0,1989	43,76
6,60	0,3285	72,27
5,40	0,3880	85,37
3,50	0,4545	100

4.2.3. Experimento 3

Os resultados obtidos para a avaliação do efeito do aquecimento sobre a precipitação das proteínas do suco são mostradas na Tabela 15.

Tabela 15. Efeito da temperatura na precipitação das proteínas do suco.

Amostra	Volume de suco/ massa concentrado obtida	Proteína (%)	Proteína na amostra (g)	% da proteína do suco precipitada
Suco	250 ml	0,089	0,223	100
1. Precipitação por acidificação a pH 3,5 e aquecimento a 80°C				
Concentrado	0,421g	30,18	0,127	56,95
2. Precipitação por acidificação a pH 3,5				
Concentrado	0,5405g	24,18	0,131	58,74

4.2.4. Processamento final

O processamento final, ou seja, o mais adequado dentre as variáveis testadas é apresentado no Fluxograma 4.

Fluxograma 4. Processamento para obtenção de Concentrado Protéico de Aguapé.

4.2.5. Rendimento

O rendimento determinado para o processamento descrito no Fluxograma 4, é mostrado no Fluxograma 5 e na Tabela 16.

Fluxograma 5. Rendimento do processo para obtenção de Concentrado Protéico de Aguapé

Tabela 16. Rendimento das operações de extração e precipitação.

Operação	R E N D I M E N T O	
	% em relação à proteína inicial	% em relação à proteína extraída
Extração	46,48	100
Precipitação	22,53	48,48

4.2.6. Determinação da redução do teor de cinza

Os resultados obtidos para a avaliação da eficiência de uma ressuspensão e lavagem do concentrado na redução do teor de cinza e perda de proteínas são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17. Efeito da lavagem do concentrado seco na redução do teor de cinza e na perda de proteína.

Amostra	Proteína (%)	Cinza (%)	% Proteína em relação à inicial	% Cinza em relação à inicial
Concentrado seco (inicial)	37,0	33,0	100	100
Concentrado lavado com água	48,44	8,74	70,63	12,80
Concentrado lavado com água pH 3,5	47,07	9,30	69,71	13,70

4.3. CONCENTRADO PROTÉICO DE AGUAPÉ

4.3.1. Composição química

Os resultados de proteína bruta, proteína verdadeira, umidade, lipídeos, cinza e carboidratos estão na Tabela 18.

Tabela 18. Composição química do CPA em porcentagens na matéria seca.

Proteína bruta (%)a	Proteína verdadeira (%)b	Umidade (%)	Lipídeos (%)	Cinza (%)	Carboidratos (%)
35,39	31,71	5,56	2,49	33,61	22,95

(a) N total x 6,25

(b) N protéico x 6,25

4.3.2. Elementos minerais

Os resultados obtidos na análise de elementos minerais de concentrado protéico de aguapé são mostrados nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 19. Elementos minerais do CPA.

N(%)	P(%)	K(%)	Ca(%)	Mg(%)	S(%)	Fe(ppm)
4,20	0,34	5,40	0,89	0,25	0,31	1.100
B(ppm)	Na(ppm)	Al(ppm)	Cl(ppm)	Ag(ppm)	Ba(ppm)	
7	65.000	1.141	27.800	21	81	

Tabela 20. Metais pesados no CPA.

	Concentração (ppm)					
	Cu	Zn	Cd	Cr	Pb	Ni
Concentrado Aguapé	20,6	40	0,5	0,05	2	1,5
Limites máximos de tolerância ¹	30	50	1	0,10	8	5

¹ Fonte: BICK (1985).

4.3.3. Aminoácidos do CPA e cômputo químico

A composição de aminoácidos do CPA e o cômputo químico em relação à caseína e à proteína padrão da FAO, são mostrados na Tabela 21.

Tabela 21. Aminoácidos do CPA e o cômputo químico

Aminoácido	Concentração g aa/100g proteína			Cômputo químico(%)	
	CPA	Caseína (a)	Padrão FAO (b)	Caseína	Padrão FAO
Lisina	4,31	8,29	5,5	51,99	78,36
Histidina	3,13	2,98			
Arginina	11,90	3,82			
Ácido aspártico	9,51	7,28			
Treonina	4,99	4,75	4,0	105,05	124,75
Serina	4,15	6,16			
Ácido glutâmico	12,34	22,50			
Prolina	4,91	11,81			
Glicina	5,60	2,02			
Alanina	6,38	3,14			
Valina	4,36	6,88	5,0	63,37	87,20
Metionina	2,33	2,85	2,2(c)	81,75	105,90
Cistina	ND	0,37			
AA Sulf. totais	ND	3,22	3,5		
Isoleucina	3,71	5,52	4,0	67,21	92,75
Leucina	9,79	9,71	7,0	100,28	139,86
Tirosina	5,24	5,94			
Fenilalanina	6,16	5,34			
AA Arom. totais	11,40	11,28	6,0	101,06	190,00
Triptofano	1,03	1,65	1,0	62,42	103,00

Fontes: (a) FAO (1970)

(b) FAO (1973)

(c) padrão FAO, segundo WOLVERTON & McDONALD (1979).

4.3.4. Avaliação biológica

Os resultados obtidos durante o experimento são apresentados na Tabela 22. O ensaio teve a duração de 17 dias, ao invés dos 28 recomendados, pois houve falta de CPA que não pode ser produzido na quantidade ideal.

Tabela 22. Ganho de peso, consumo de ração e consumo de proteína durante o experimento.

Grupo (Fonte protéica na ração)	Número de animais	PI (g) peso inicial	PF (g) peso final	ΔP PF - PI	Consumo de ração (g)	Consumo de proteína (g)
Caseína	6	41,15 ± 3,43	75,87 ± 10,58	34,72 ± 7,98	98,85 ± 19,96	10,18 ± 2,06
Aprotéico	6	40,87 ± 2,83	31,78 ± 4,08	-9,1 ± 2,26	42,1 ± 12,57	0,16 ± 0,05
Aguapé	i = 6 f = 5(a)	41,54 ± 3,42	34,20 ± 3,53	-7,34 ± 1,73	42,38 ± 12,42	4,41 ± 1,29

a = um dos animais morreu no 5º dia do ensaio.

4.3.4.1. Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) e Coeficiente de Eficácia Protéica (CEP)

Observou-se que os animais que receberam CPA como fonte protéica na ração perderam peso em relação ao peso inicial, por esta razão CEA e CEP são nulos nas condições do experimento.

4.3.4.2. Coeficiente de Digestibilidade

Encontrou-se os seguintes valores de coeficiente de digestibilidade:

CPA = 53,56%

caseína = 92,00%

4.3.4.3. Razão Protéica Líquida (RPL)

Encontrou-se os seguintes valores de RPL:

$$\text{CPA} = 0,46 \pm 0,32$$

$$\text{caseína} = 4,32 \pm 0,25$$

4.3.5. Propriedades funcionais

4.3.5.1. Solubilidade

Na Tabela 23 estão os valores de solubilidade da proteína bruta, encontrados para o Concentrado protéico de aguapé em função do pH, à temperatura ambiente, com concentração de 1% de concentrado protéico.

Tabela 23. Solubilidade do CPA.

pH	Proteína solúvel (% da proteína total)
2	11,23
3	11,30
4	9,46
5	11,63
6	13,72
7	13,77
8	17,32
9	21,71
10	20,00
11	21,11
12	23,68

4.3.5.2. Dispersibilidade

A porcentagem de proteína que permaneceu em dispersão nas condições da determinação foi 15,13%

4.3.5.3. Absorção de água

A capacidade de absorção de água observada para o CPA foi de 2,164 ml de água/g de concentrado. Se considerarmos a capacidade de absorção de água em função da proteína presente no concentrado têm-se 5,848 ml água/g de proteína.

4.3.5.4. Absorção de óleo

Os valores de absorção de óleo encontrados foram: 1,462 ml de óleo/g de concentrado, e em relação à proteína: 3,95 ml de óleo/g de proteína.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. MATÉRIA-PRIMA

Os valores encontrados nas análises efetuadas no aguapé "in natura" são mostradas na Tabela 12. Os resultados são compatíveis com os encontrados na literatura, as diferenças observadas são atribuídas à grande alteração na composição química que o aguapé pode apresentar devido às diferenças nas condições de crescimento, conforme relatado por WOLVERTON & McDONALD (1979).

5.2. PARAMETROS MAIS ADEQUADOS DE PROCESSAMENTO

Com relação à eficiência dos extratores testados, observa-se pela análise da Tabela 13 que NaOH é mais eficiente em promover a extração ou solubilização das proteínas de aguapé. Este resultado é coerente com o relatado por vários pesquisadores e relaciona-se principalmente com o pH durante a extração. O uso de NaOH proporciona a condição alcalina necessária para uma boa extração conforme demonstrado por SPENCER (1971) e BETSCHART & KINSELLA (1973).

Pela observação dos resultados do experimento 2 constatou-se, conforme pode ser visto na Tabela 14, que para as mesmas condições de solubilização das proteínas e mesma temperatura e tempo de tratamento, o pH durante a precipitação das proteínas tem grande efeito sobre o rendimento do processo. A precipitação é mais eficaz sob condições de pH baixo, a quantidade de concentrado obtida mediante a precipitação a pH 3,5 foi 2,2 vezes maior que a obtida a pH 11,86. O resultado era esperado, uma vez que o ponto isoelétrico das proteínas de folhas encontra-se entre os valores de 3 e 5, segundo LU & KINSELLA (1972).

Os resultados do experimento 3, observados na Tabela 15, mostram que para as mesmas condições de solubilização das proteínas a precipitação com ou sem aquecimento a pH 3,5, ou seja, próximo do ponto isoelétrico, mostra eficiência bastante parecida (56,95% contra 58,74%). Considerando também os efeitos deletéreos do aquecimento sobre as propriedades funcionais das proteínas causados pela desnaturação das mesmas pelo calor (MILLER et alii, 1975) conclui-se que o melhor método de precipitação é aquele que envolve apenas a alteração do pH sem aquecimento. Contudo, MORRISON & PIRIE (1961), observaram que o aquecimento é usado na precipitação das proteínas em larga escala devido ao efeito que exerce sobre a consistência do coágulo formado o que é importante quando se promove a separação do material protéico por filtração, técnica normalmente usada.

Com base no que foi relatado, montou-se o Fluxograma 4 que representa as melhores condições de processamento dentre as variáveis testadas. As amostras usadas para as análises de concentrado foram obtidas de acordo com este fluxograma.

Pela observação do Fluxograma 5 e da Tabela 16, verifica-se os rendimentos de cada etapa da produção de concentrado protéico de aguapê nas condições do experimento.

Conseguiu-se extração de 46,48% da proteína do aguapê (folhas + pecíolos) valor que está compatível com os valores relatados na literatura (35 a 60% para folhas de alfa_fa, segundo KOHLER & KNUCLES (1977), embora alguns pesquisadores tenham obtido porcentagens de extração mais elevadas para aguapê (54,9%, segundo MITSUDA et alii (1978)).

Um dos fatores que contribuiu para que não se alcançasse maiores porcentagens de extração provavelmente foi o fato da adição de NaOH ter sido feita após a desintegração da planta, e não antes ou durante, desta forma permitiu-se que pelo rompimento dos vacúolos se estabelecesse uma condição ácida com possíveis efeitos sobre as proteínas, podendo ter ocorrido a coagulação das proteínas solúveis e agregação das estruturas particuladas com efeitos negativos sobre a extração.

Com relação ao rendimento da etapa de precipitação e recuperação verifica-se na Tabela 16 e no Fluxograma 5, que conseguiu-se recuperar 48,48% da proteína presente no

suco, o que representa 22,53% da proteína original, de onde se observa que cerca da metade da proteína extraída foi perdida nesta operação. Uma vez que se trabalhou com valores de pH próximo ao ponto isoeletrico da maioria das proteínas de folhas (LU & KINSELLA (1972), supõe-se que a deficiência desta etapa deveu-se mais à separação do coágulo formado do que à precipitação das proteínas em si, embora indiretamente o agente de precipitação exerça influência sobre a eficiência da separação pelo seu efeito sobre a consistência do coágulo formado, conforme relatado por MORRISON & PIRIE (1961).

Comparando-se os resultados obtidos e apresentados no Fluxograma 5 e na Tabela 16 com os obtidos por KOHLER & DE FREMEY (1977) para alfafa, apresentados em 2.3, verifica-se que o rendimento do processo como um todo foi baixo. Perdeu-se 49,93% da proteína bruta original na fração fibrosa, contra 33% no trabalho relatado pelos autores, conseguiu-se a recuperação no concentrado de 22,53% da proteína original contra 52% no processo Pro Xan e perdeu-se 22,09% da proteína no sobrenadante ou fração solúvel após a precipitação das proteínas, contra 15% no processo Pro Xan, segundo KOHLER & DE FREMEY (1977). As diferenças observadas podem ser atribuídas a vários fatores, o primeiro a ser lembrado é a diferença de comportamento observada entre espécies diferentes e entre plantas em diferentes estágios de maturação. Muito do baixo rendimento observado pode ser atribuído à inadequação dos equipamentos utilizados, acredita-se que a otimização de cada

etapa através da utilização de equipamentos adequados para romper eficientemente as células e suas organelas durante a etapa de desintegração e para promover uma separação eficaz tanto da fração fibrosa e suco verde como do coágulo protéico levará a um melhor rendimento do processo. As considerações tecidas com relação à extração das proteínas também devem ser lembradas, a adição do extrator e conseqüente alcalinização do material deveria ter sido feita durante a desintegração e não após.

Cumpre lembrar também que os resultados obtidos por KOHLER & DE FREMERY (1977) usados para esta comparação são melhores do que os resultados normalmente relatados e foram obtidos, segundo os autores, mediante o aprimoramento do processo Pro Xan, com a utilização de um equipamento especialmente desenvolvido capaz de promover uma desintegração mais eficaz das células, e da reciclagem do sobrenadante obtido após a separação do coágulo protéico que foi adicionado ao material durante a etapa de desintegração, o que é mais facilmente executável em um processo contínuo, que não foi o caso do experimento objeto desta dissertação.

As análises do concentrado obtido conforme o Fluxograma 4 revelaram um alto teor de cinza (33,61%), segundo a Tabela 18, foi tentada, então, em caráter preliminar, a redução deste teor através de uma lavagem do concentrado protéico com água e com solução HCl com pH 3,5, os resultados obtidos são mostrados na Tabela 17. Observou-se nos dois casos uma considerável redução do teor de cinza (87,20% para lava-

gem com água, e 86,30% para solução pH 3,5), mas esta redução foi acompanhada de uma perda expressiva de proteína (29,37% para água e 30,29% para solução com pH 3,5). Concluiu-se que a lavagem do concentrado seco, nas condições testadas, embora eficaz na remoção da cinza não deve ser usada, devendo as operações de lavagem necessárias serem feitas durante as etapas do processamento, conforme relatado por BICKOFF *et alii* (1975).

5.3. CONCENTRADO PROTÉICO DE AGUAPÉ

A composição centesimal do CPA apresentou algumas diferenças em relação às encontradas para concentrados protéicos, conforme pode ser observado pela análise das Tabelas 18,7 (concentrados de alfafa, segundo KOHLER & KNUCKLES, 1977) e 2 (concentrado de aguapé, segundo ABO BAKR *et alii*, 1984).

Observa-se grande diferença com relação ao teor de cinza, 33,61% para o concentrado de aguapé obtido, contra 11,1% para concentrados integral de alfafa e 5,81% para o concentrado de aguapé produzido por ABO BAKR *et alii* (1984). Acredita-se que o alto teor de cinza observado no concentrado protéico de aguapé esteja relacionado com a formação e precipitação de NaCl, formado a partir de NaOH (usado como extrator) e HCl (usado na acidificação para precipitação das proteínas). Esta suposição é reforçada pelo alto teor de Na encontrado no concentrado (65.000 ppm, conforme Tabela 19).

O teor de lipídeos observado foi cerca de 3 vezes e meia mais baixo do que o concentrado de alfafa, segun

do KOHLER & KNUCKLES (1977), e cerca de seis vezes e meia menor que o do concentrado de aguapé produzido por ABO BAKR *et alii* (1984).

O teor de carboidratos encontrados está compatível com o observado por ABO BAKR *et alii* (1984).

O teores de minerais de aguapé são bastante variáveis com as condições de cultivo, principalmente com a composição do meio no qual cresce, conforme foi relatado por KNIPLING *et alii* (1970) e desta forma, não foi possível estabelecer parâmetros para a compração dos teores presentes nos concentrados proteícos.

Com relação aos metais pesados, observou-se que no concentrado obtido os teores estão abaixo dos limites máximos de tolerância para a legislação brasileira, conforme pode ser visto na Tabela 20. Contudo, este resultado não pode ser generalizado, pois embora tenha sido mostrado por WOLVERTON (1975) que 97% dos metais pesados permanecem nas raízes, enquanto que apenas 3% são encontrados na parte aérea das plantas, a composição química é variável com as condições de cultivo.

A Tabela 21 apresenta as concentrações de aminoácidos presentes no CPA. Esta tabela mostra que todos os aminoácidos essenciais estão presentes e que o valor nutricional do CPA é limitado pelo teor de lisina. Como o cálculo químico de uma proteína é determinado em função do aminoácido essencial mais limitante, verifica-se que o cálculo químico do

CPA é 51,99% em relação à caseína e 76,36% em relação à proteína padrão da FAO. O teor de cistina não foi determinado; por esta razão não foi possível estabelecer o valor do cômputo do CPA em relação aos aminoácidos sulfurados totais, conforme recomendado por PELLETT & YOUNG (1980), entretanto, foi calculado o cômputo para a metionina individualmente, o que embora não seja a situação ideal, fornece uma indicação da adequação da composição da proteína testada.

Pela comparação da Tabela 21 com as Tabelas 3 e 8 que mostram respectivamente as concentrações de aminoácidos em concentrados de aguapé (segundo WOLVERTON & McDONALD (1979) e MITSUDA *et alii* (1978) e em concentrados de alfafa segundo BICKOFF *et alii* (1975) observa-se que os teores encontrados diferem pouco dos relatados na literatura. A mais importante diferença observada foi com relação ao teor de lisina, que no CPA mostrou-se limitante, o que não se verificou nos demais concentrados conforme mostram as tabelas.

BUCHANAN (1969a), observou que embora em preparações de folhas frescas os aminoácidos sulfurados sejam limitantes, durante o aquecimento a lisina é muito mais afetada que estes, o que pode levar a uma condição em que a lisina seja o aminoácido limitante no concentrado. Como a precipitação do material protéico na preparação do CPA testado não envolveu aquecimento, pode-se atribuir parcialmente à operação de secagem o baixo teor de lisina no CPA.

Por outro lado, como pode ser visto no Fluxo -

grama 4, o material permaneceu sob condição fortemente alcalina (pH 11,86) durante 1 h à temperatura ambiente, o que possivelmente favoreceu a ocorrência da reação de Maillard com grande intensidade, fato que também pode ser responsabilizado pelo baixo teor de lisina no CPA, uma vez que este aminoácido é o mais passível de sofrer esta reação de escurecimento não enzimico.

O cômputo químico do CPA poderia ser melhorado através do estabelecimento de condições menos propícias para a ocorrência da reação de Maillard, dessa forma, a alcalinização durante a etapa de extração poderia ser menos intensa, sendo mais indicado trabalhar com pH próximo a 8, conforme recomendado por BETSCHART & KINSELLA (1973), do que utilizar NaOH na proporção empregada (3 partes de NaOH 0,05N para 1 parte de aguapé) que levou a uma condição fortemente alcalina (pH = 11,86) favorecendo sobremaneira a ocorrência da reação de Maillard e suas implicações principalmente sobre o teor e a disponibilidade de lisina.

A avaliação da qualidade de uma proteína vegetal através do cômputo químico muitas vezes fornece resultados diferentes daqueles encontrados em ensaios biológicos, o que se deve basicamente à baixa digestibilidade e baixa disponibilidade de aminoácidos normalmente observadas, por esta razão, o cômputo químico deve ser corrigido pela digestibilidade.

Através da análise dos dados obtidos no ensaio

biológico (Tabela 22) verifica-se que os animais que receberam ração contendo CPA como única fonte protéica apresentaram perda de peso em relação ao peso inicial, os resultados mostra-ram-se aquém do esperado em função da composição da proteína e não podem ser explicados apenas pela baixa digestibilidade (53,36 para o CPA contra 92,00 para a caseína).

Como houve perda de peso para os animais que receberam CPA como fonte protéica, os valores de Coeficiente de Eficácia Alimentar e Coeficiente de Eficácia Protéica são considerados nulos, o que significa que o CPA, nas condições do experimento, não se mostrou eficaz em promover o crescimento.

O alto teor de cinza presente no CPA (33,61 %, conforme Tabela 18), provavelmente NaCl, pode ter contribuído para o baixo resultado observado por limitar a ingestão da ração, na Tabela 22 observa-se que o consumo da ração contendo o CPA foi muito baixo (42,38g, contra 98,85g para a caseína). Segundo SUBBA RAU et alii (1972) a aceitabilidade é um dos principais fatores a ser considerado na avaliação nutri-cional dos concentrados protéicos de folhas. Por esta razão recomenda-se que seja tentada a produção de um concentrado com teor de cinza mais baixo através das alterações no processamento já discutidas, a fim de reduzir a interferência da aceitabilidade na avaliação nutricional.

Outro importante fator a se lembrado é que os efeitos da reação de Maillard se fazem sentir mais sobre a dis

ponibilidade do que sobre o teor dos aminoácidos, em especial a lisina, podendo-se atribuir a este fato o baixo resultado encontrado na adeterminação da Razão Protéica Líquida (0,40 para o CPA contra 4,30 para a caseína).

Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade da presença de substância tóxica, uma vez que houve a morte de um dos animais em função dos resultados observados.

Recomenda-se proceder às alterações já discutidas no processamento, tanto visando a produção de um CPA com mais baixo teor de cinza, como a obtenção de um produto com melhor qualidade protéica pela minimização da ocorrência da reação de Maillard e de seus efeitos deletéreos.

5.4. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO CPA

Como pode ser visto na Tabela 23 a solubilidade do concentrado protéico de aguapê mostrou-se muito baixa.

Como não se dispõe de dados acerca da solubilidade de outros concentrados protéicos de aguapê nem mesmo de concentrados produzidos a partir de folhas de outras espécies

seguindo a mesma linha de processamento, uma vez que a maior parte dos experimentos relatados na literatura trabalhou-se com concentrados produzidos a partir da fração solúvel ou a partir de sucos verdes clarificados, não se pode avaliar com certeza se a baixa solubilidade observada resulta de problemas do processamento ou se é característica da espécie estudada.

Pela comparação dos dados obtidos com aqueles encontrados por KOHLER & KNUCKLES (1977) para a fração "branca" de alfafa, verifica-se as grandes diferenças de comportamento. Deve-se ressaltar que o concentrado de aguapê foi produzido pela precipitação das duas forças protéicas: solúvel e insolúvel conjuntamente, enquanto que o concentrado de alfafa em questão foi produzido a partir da fração "branca" ou solúvel.

Entretanto, algumas considerações podem ser feitas. Segundo KINSELLA (1976) a solubilidade é bastante dependente dos tratamentos aos quais as proteínas são submetidas e do meio em que são solubilizadas. O autor afirma que embora a precipitação por acidificação, ou seja, precipitação isoelétrica seja o método de recuperação de proteínas que causa menor desnaturação e conseqüentemente menores alterações nas propriedades funcionais, a exposição prolongada à ação do ácido pode causar perda de solubilidade, o que já foi observado para proteínas de soja. Segundo LEHNINGER (1976) os

sais neutros têm grande efeito sobre a solubilidade das proteínas e a capacidade destes sais de influenciarem a solubilidade das proteínas é função de sua força iônica, acarretando alterações na tendência à ionização dos grupos R dissociáveis da proteína. Uma vez que foi constatado o alto teor de cinza no concentrado protéico e que suspeita-se que grande parte desta cinza seja NaCl, existe a possibilidade desse sal estar influenciando a solubilidade da proteína presente no concentrado protéico.

Outro fator bastante importante que pode estar reduzindo a solubilidade do concentrado é a presença de enzimas proteolíticas e oxidativas nas folhas. Segundo BETSCHART & KINSELLA (1973) a fenol-oxidase e a peroxidase catalisam a redução de o-difenóis a quinonas que em presença de O₂ polimerizam e complexam com proteínas reduzindo sua solubilidade e digestibilidade.

Acredita-se que a introdução de modificações no processamento contribua para a obtenção de concentrados protéicos com melhores perfis de solubilidade. A introdução de lavagens levaria à obtenção de concentrados com teor de cinza mais baixo, e desta forma, a influência de sais e outras substâncias solúveis presentes seria diminuída. A adição de agentes redutores durante a fase de extração também poderia trazer melhora para a solubilidade da proteína, pois as reações catalisadas pelas enzimas peroxidase e fenol-oxidase anteriormente referidas seriam inibidas.

O resultado encontrado para a dispersibilidade da proteína do CPA é compatível com os valores de solubilidade encontrados e provavelmente sujeita-se às mesmas considerações tecidas com relação à solubilidade.

O valor encontrado para a capacidade de absorção de água, 2,164 ml de água/g de concentrado ou expresso em proteína, 5,848 ml de água/g de proteína, está bem próximo dos observados para outras proteínas de folhas, segundo WANG & KINSELLA (1976) a capacidade de absorção de água de proteína de alfafa varia de 1,80 a 3,77 ml de água/g de proteína, dependendo do processamento utilizado.

Normalmente os valores de capacidade de absorção de água são apresentados por g de proteína, mas sabe-se que, segundo KINSELLA (1976), componentes não protéicos podem afetar marcadamente a absorção de água de uma preparação protéica. Segundo este mesmo autor, a capacidade de retenção de água varia com a fonte de proteína, composição e presença de carboidratos, lipídeos, sais, com o pH e pode ser influenciada por processamentos sofridos pela proteína como aquecimento, alcalinização, etc. Foi observado também que a capacidade de absorção de água aumenta com a concentração de proteína. Com base nestas informações considera-se que no caso de concentrados protéicos como o CPA, será mais acertado expressar a capacidade de absorção de água em função do concentrado protéico e não atribuir esta característica exclusivamente à proteína.

Os valores encontrados para absorção de óleo

estão compatíveis com os encontrados para proteínas de folhas de alfafa por WANG & KINSELLA (1976) e as mesmas considerações tecidas em relação à absorção de água podem ser estendidas a esta propriedade.

De uma forma geral, os resultados encontrados nas determinações das propriedades funcionais do concentrado protéico de aguapê indicam que devem ser tentadas alterações no processamento visando melhorar em especial a solubilidade, e desta forma, estender as possibilidades de aplicação deste produto. Por outro lado, como os concentrados protéicos integrais normalmente são usados na alimentação animal, pois sua utilização em formulações alimentícias é limitada principalmente por suas características organolépticas, considera-se que a conveniência de se estudar mais detalhadamente as propriedades funcionais dos concentrados de folhas, com determinações de propriedades funcionais mais específicas como capacidade de formar espuma, emulsões e gel protéico, e conseqüentemente buscar a obtenção de concentrados com melhores características tecnológicas esteja condicionada à produção de concentrados "brancos", em que os problemas de "flavor" e cor não sejam limitantes.

6. CONCLUSÕES

O experimento desenvolvido permite as seguintes conclusões:

1. A composição química do aguapé torna possível sua utilização como matéria-prima na obtenção de concentrado protéico, e a produção deste é viável com base na tecnologia disponível.
2. O melhor processo, estabelecido a partir das variáveis testadas envolve: lavagem, corte, separação e descarte das raízes, desintegração em moinho de martelos, extração das proteínas em meio alcalino, centrifugação e descarte da porção fibrosa, precipitação das proteínas por acidificação, separação do material precipitado por decantação e secagem para obtenção do produto final.
3. A extração das proteínas é mais eficaz sob condições alcalinas, sendo N_2OH o mais eficaz dentre os extratores testados.
4. A precipitação das proteínas por acidificação a pH 3,5 é tão eficaz quanto a precipitação conseguida por aquecimento, o que possibilita a obtenção de concentrado protéico sem o emprego de altas temperaturas.

5. A lavagem do concentrado seco através de ressuspensão em água ou solução ácida apesar de eficiente na redução do teor de cinza do produto leva a considerável perda de proteína.
6. A composição química do concentrado não é a ideal, o teor protéico mostrou-se aquém do desejável e o teor de cinza muito elevado.
7. Todos os aminoácidos essenciais estão presentes no concentrado e sua qualidade nutricional é limitada pela deficiência em lisina.
8. O concentrado protéico obtido nas condições do experimento não se mostrou eficaz em promover o crescimento dos animais utilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO BAKR, T.M.; EL-SHEMI, N.M.; MESALLAM, A.S. Isolation and chemical evaluation of protein from water hyacinth. *Qual. Plant Plant Foods Hum. Nutr.*, 34:67-73, 1984.
- AKESON, W.R. & STAHMANN, M.A. Nutritive value of leaf protein concentrate, an "in vitro" digestion study. *J. Agr. Food Chem.*, 13:146, 1965.
- ALTSCHUL, A.M. (ed.) *New Protein Foods*. New York, Academic Press, 1974. v.1, 511p.
- AOAC. *Official methods of analyses of the Assoc. Off. Agric. Chem.* HORWITZ, W. (ed.). Washington, D.C., 1975. 1018p.
- BETSCHART, A. & KINSELLA, J. Extratibility and solubility of leaf protein. *J. Agr. Food Chem.*, 21(1):60-5, 1973.
- BICK, L.F. *Compêndio da Legislação de Alimentos; Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos*. São Paulo, Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, 1985. v.1.
- BICKOFF, E.M.; BOOTH, A.N.; DE FREMERY, D.; EDWARDS, R. H.; KNUCKLES, B.E.; MILLER, R.E.; SAUNDERS, R.M. & KOHLER, G. O. Nutritional evaluation of alfafa leaf protein concentrate. In: FRIEDMAN, M. *Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds*, New York, Marcel Bekker, Inc., 1975. p.319-40.

- BONDI, A. Plant protein. In: ALTSCHUL, A.M. *Processed Plant Protein Foodstuffs*. New York, Academic Press, 1958. p. 43-66.
- BONNER, J. & GALSTON, A.W. *Princípios de Fisiologia Vegetal*. Tradução de Portillo, F. Madri, Aguilar Editores, 1967.
- BRAY, W.J.; HUMPHRIES, C.; INERITEI, M.S. The use of solvents to decolorise leaf protein concentrate. *J. Sci. Fd. Agric.*, 29:165-71, 1978.
- BRAY, W.J. & HUMPHRIES, C. Solvent fractionation of leaf juice to prepare green and white protein products. *J. Sci. Fd. Agric.*, 29:839-46, 1978.
- BRAY, W.J. & HUMPHRIES, C. Preparation of white leaf protein concentrate using a polyanionic flocculant. *J. Sci. Fd. Agric.*, 30:171-6, 1979.
- BUCHANAN, R.A. "In vivo" and "in vitro" methods of measuring nutritive value of leaf protein preparations. *Br. J. Nutr.* 23:533-44, 1969a.
- BUCHANAN, R.A. Effect of storage and lipid extraction on the properties of leaf protein. *J. Sci. Fd. Agric.*, 20:359-64, 1969b.
- BUTLER, J.B. An investigation into some cause of the differences of protein expressibility from leaf pulps. *J. Sci. Fd. Agric.*, 33:528-36, 1982.
- BYERS, M. Extraction of protein from the leaves of some plants growing in Ghana. *J. Sci. Fd. Agric.*, 12:20-30, 1961.

- BYERS, M. The amino acid composition and "in vitro" digestibility of some protein fractions from three species of leaves of various ages. *J. Sci. Fd. Agric.*, 22:242-51, 1971.
- BYERS, M. & STURROCK, J.M. The yields of leaf protein extracted by large scale processing of various crops. *J. Sci. Fd. Agric.*, 16:341-55, 1965.
- CARLSSON, R. & HANCZAKOWSKI, P. The nutritive value of mixtures of white leaf protein and food proteins. *J. Sci. Fd. Agric.*, 36:946-50, 1985.
- CESP. Aguapê, uma praga gerando energia. *CESPAULISTA*, 29: 31-3, 1981.
- CHAYEN, I.H.; SMITH, R.H.; TRISTAM, G.R.; THIRKELL, D.; WEBB, T. The isolation of leaf components.I. *J. Sci. Fd. Agric.*, 12:502-12, 1961.
- CHIBNALL, A.C; REES, M.W.; LUGG, J.W. The amino acid composition of leaf proteins. *J. Sci. Fd. Agric.*, 14:234-9, 1963.
- COWLISHAW, S.J.; EYLES, D.E.; RAYMOND, W.F.; TILLEY, J.M.A. Nutritive value of leaf protein concentrates. II. Effects of processing methods. *J. Sci. Fd. Agric.*, 7:775-80, 1956.
- DANIELSON, C.E. Plant proteins. *Annual Review of Plant Physiology* 7:215-36, 1956.
- DAVYS, M.N. & PIRIE, N.W. A laboratory scale press for extracting juice from leaf pulp. *Biotech. and Bioeng.* 11: 529-38, 1969.

- DE FREMERY, D.; MILLER, R.E.; EDWARDS, R.H.; KNUCKLES, B. E.; BICKOFF, E.M.; KOHLER, G.O. Centrifugal separation of white and green protein fractions from alfalfa juice following controlled heating. *J. Agric. Fd. Chem.*, 21(5): 886-9, 1973.
- DONNELLY, P.E.; MCDONALD, R.M.; RATTRAY, P.V. Protein extraction from pasture: Effect of crop species and of a reducing agent on the quality of extracted protein. *J. Sci. Fd. Agric.*, 34:828-38, 1983.
- EDWARDS, R.H.; MILLER, R.E.; DE FREMERY, D.; KNUCKLES, B.E.; BICKOFF, EM.; KOHLER, G.O. Pilot plant production of an edible white fraction leaf protein concentrate from alfalfa. *J. Agric.Fd. Chem.*, 23(4):620-6, 1975.
- EDWARDS, R.H.; DE FREMERY, D.; MACKEY, B.E.; KOHLER, G.O. Factors affecting juice extraction and yield of leaf protein concentrate from chopped alfalfa. *Transaction of the ASAE (Am. Soc. Agric. Eng.)*, 20(3):423-8, 1977.
- FANTOZZI, P. & SENSIDONI, A. Protein extraction from tobacco leaves: technological, nutritional and agronomical aspects. *Qual. Plant Plant Foods Hum. Nutric.*, 32:351-68, 1983.
- FAO Nutritional Studies. Amino acid content of foods and biological data on proteins. *Amino acid content of foods*. Rome, Italy, 1970.
- FAO/OMS. Necesidades de energia y de proteinas. *Serv. Int. Tecn. Org. Mund. Salud.*, Ginebra, (522):1-138, 1973.

FAUCONNEAU, G. World protein supplies: The role of plant protein. *Qual. Plant Plant Foods Hum. Nutr.*, 32:205-23, 1983.

FIorentini, R. & GALOPPini, C. Pilot plant production of an edible alfafa protein concentrate. *J. Food Sci.*, 46:1514-7, 1981.

FIorentini, R. & GALOPPini, C. The proteins from leves. *Qual. Plant Plant Foods Hum. Nutr.*, 32:335-50, 1983.

GERLOFF, ED.; LIMA, I.H.; STAHMANN, M.A. Amino acid composition of leaf protein concentrates. *J. Agric. Fd. Chem.*, 13:139-43, 1965.

HENRY, K.M. & FORD, J.E. The nutritive value of leaf protein concentrates determined in biological tests with rats and by microbiological methods. *J. Sci. Fd. Agric.*, 16:425-32, 1965.

JANICKI, N.A. & WALCZAK, J. Waterriness in meat and methods for its determinations, discussed in HAM, R. Biochemistry of meat hidration. *Adv. Food Res.*, 10:355, 1954.

JOLY, A.B. *Introdução à Taxonomia Vegetal*. São Paulo, Nacional, 1966. 745p.

KIES, C. Bioavailability: A factor in protein quality. *J. Agric. Fd. Chem.*, 29:435-40, 1981.

KINSELLA, J.E. Functional properties of proteins in foods: a survey. *CRC Crit. Rev. Fd. Sci. Nutr.*, 7(3):219-80, Cleveland, 1976.

- KNIPLING, E.B.; WEST, S.H.; HALLER, W.T. Growth characteristics, yield potential and nutritive content of Water Hyacinths. *Soil and Crop Soc. Soc. of Florida Proceedings*, 30:51-63, 1970.
- KNUCKLES, B.E.; BICKOFF, E.M.; KOHLER, G.O. Pro-xan process: Methods for increasing protein recovery from alfafa. *J. Agric. Fd. Chem.*, 20:1055-7, 1972.
- KNUCKLES, B.E.; EDWARDS, R. H.; KOHLER, G. O.; WHITNEY, L.F. Flocculants in the separation of green and soluble white protein fractions from alfafa. *J. Agric. Fd. Chem.*, 28: 32-6, 1980.
- KNUCKLES, B.E. & KOHLER, G.O. Functional properties of edible protein concentrates from alfafa. *J. Agric. Fd. Chem.*, 30:748-52, 1982.
- KOHLER, G.O. & DE FREMERY, D. Production and processing of alfafa protein for foods and feeds. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON THE UTILIZATION OF AGRICULTURAL WASTES FOR FEED AND FOOD, Brasil, dezembro 1977. 22p.
- KOHLER, G.O. & KNUCKLES, B.E. Edible protein from leaves. *Food Techn.*, 31:191-195, 1977.
- KOHLER, G.O.; EDWARDS, R.H.; KNUCKLES, B.E.; DE FREMERY, D.; MILLER, R.E. Means of increasing yields of leaf protein concentrate. In: ANNUAL MEETING AM. SOC. AGRIC. ENG. NORTH CAROLINE STATE UNIVERSITY, 1977. 17p.
- KOHLER, G.O. & LYON, CK. Plant protein sources. In: WHITAKER, J.R. & TANNENBAUM, S.R. *Food Proteins*. Westport, AVI Publishing Company Inc., 1977. 603p.

- KUNG, S.D. Fraction I protein: A unique genetic marker. *Science*, 191:429-34, 1970.
- KUNG, S.D.; SAUNDER, J.A.; TSO, T.C.; VAUGHN, D.A.; WOMACK, M.; STAPLES, R.C.; BEECHER, G.R. Tobacco as a potential food source and smoke material: nutritional evaluation of tobacco leaf protein. *J. Fd. Sci.*, 45:320-7, 1980.
- LEHNINGER, A.L. *Bioquímica*. São Paulo, Ed. Edgard Blucher. 1976.
- LIMA, I.H.; RICHARDSON, T.; STAHMANN, M.A. Fatty acids in some leaf protein concentrates. *J. Agric. Fd. Chem.*, 13: 143-5, 1965.
- LU, P. & KINSELLA, J.E. Extratability and properties of protein from alfalfa leaf meal. *J. Food Sci.*, 37:94-9, 1972.
- MALIWAL, B.P. "In vitro" methods to assess the nutritive value of leaf protein concentrate. *J. Agric. Fd. Chem.*, 31:315-9, 1983.
- McWATERS, K.H. & HOLMES, M.R. Influence of pH and salt concentration on nitrogen solubility and emulsification properties of soy flour. *J. Food Sci.*, 44:770-3, 1979.
- MILLER, R.E; DE FREMERY, D.; BICKOFF, E.M. Soluble protein concentrates from alfalfa by low temperature acid precipitation *J. Agric. Fd. Chem.*, 23:1177-80, 1975.
- MITSUDA, H.; HIGUCHI, M.; SHIRAI, K.; YAMAMOTO, A. Protein concentrate from water Hyacinth and its amino acid composition. *J. Japanese Soc. Fd. Nutr.*, 31(1):99-102, 1978.

- MORRISON, J.E. & PIRIE, N.W. The large scale production of protein from leaf extracts. *J. Sci. Fd. Agric.*, 12: 1 - 5, 1961.
- NAGY, S.; TELEK, L.; HALL, N.T.; BERRY, R.E. Potential food uses of tropical and subtropical plant leaves. Abstracts of Papers, American Chem. Soc., 173. In: *Food Sci. Tech. Abstr.*, 9(3), 1977.
- OELSHLEGEL JR., F.J.; SCHROEDER, J.R.; STAHMANN, M.A. Potential for protein concentrates from alfalfa and waste green plant materials. *J. Agric. Fd. Chem.*, 17: 791-5, 1969.
- OPIENSKA-BLAUTH, J. et alii. A new rapid method as determining tryptophan. *Anal. Biochem.*, 6: 69-76, 1963.
- PARRISH, G.K.; KOGER, M.; WEAVER, J.C. The properties of leaf protein as a human and a close look at alfalfa. *CRC Crit Rev. Food Techn.*, 5(1): 1-13, 1974.
- PELLETT, P.L. & YOUNG, V.R. *Nutritional evaluation of protein foods*. From the CHARTER OF THE UNITED NATIONS UNIVERSITY. Tokyo, Japan, 1980.
- SGARBIERI, V.C. Potencial das proteínas de folhas na alimentação animal e humana. *Bol. SBCTA*, 38: 18-25, 1976.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. Automatic Recording Apparatus for use in the Chromatography of Amino Acids. *Anal. Chem.*, 30: 1190-206, 1958.
- SPENCER, R.R.; MOTTOLA, A.C.; BICKOFF, E.M.; CLARK, J. P. ; KOHLER, G.O. The pro-xan process; the design and evaluation of a pilot plant system for the coagulation and separation of the leaf proteins from alfalfa juice. *J. Agric. Fd. Chem.* 19: 504-7, 1971.

- SUBBA RAO, M.S.; SINGH, N.; PRASANNAPPA, G. Preservation of leaf protein concentrate. *J. Sci. Fd. Agric.*, 18: 295 - 8, 1967.
- SUBBA RAU, B.H.; RAMANA, K.V.R.; SINGH, N. Studies on nutritive value of leaf proteins and some factors affecting their quality. *J. Sci. Fd. Agric.*, 23: 233-45, 1972.
- TAYLOR, K.G. & ROBBINS, R.C. The amino acid composition of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and its value as a protein supplement. *Hyacinth Control J.*, 7: 24-5, 1968.
- TENUTA FILHO, A. Caracterização nutricional e funcional da proteína recuperada de cefalotórax de camarão-rosa e estudo do aproveitamento do produto residual. São Paulo, 1983. 79p. (Doutoramento - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP).
- WANG, J.C. & KINSELLA, J.E. Functional properties of novel proteins: alfafa leaf protein. *J. Food Sci.*, 41: 286 - 92, 1976.
- WILDMAN, S.G. & JAGENDORF, A.T. Leaf proteins. *Annual Rev. Plant Physiology*, 3:131-48, 1952.
- WOLVERTON, B.C. Waterhyacinth for removal of cadmium and nickel from polluted waters. Bay St. Louis, Mississippi, NASA (NASA Technical Memorandum, TM-X-72721), 1975.
- WOLVERTON, B.C. The water hyacinth. *Mazingira*, 11: 59-65, 1979.

WOLVERTON, B.C. & McDONALD, R.C. The water hyacinth from prolific pest to potential provider. *AMBIO*, vol. 8, nº 1, 1979.

WOLZAK, A.; ELIAS, L.G.; BRESSANI, R. Protein quality of vegetable proteins as determined by traditional biological methods and rapid chemical assays. *J. Agric. Fd. Chem.*, 29:1063-8, 1981.

ZAGATTO, E.A.G.; JACINTHO, A.U.; REIS, B.F.; KRUG, F.J.; BERGAMIN FILHO, H.; PESSENDA, L.C.R.; MORTATTI, J.; GINE, M.F. *Manual de análises de plantas e águas empregando sistema de injeção em fluxo*. Piracicaba, USP/CENA, 1981. 45p.