

ELIANA CARLA GOMES DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DE PLASTEÍNA OBTIDA DA
PROTEÍNA DA FOLHA DE MANDIOCA, DA SOJA E DO SORO DE
QUEIJO

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Curso de Agroquímica,
para obtenção do título de “Magister
Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
MAIO - 1997

ELIANA CARLA GOMES DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL DA PLASTEÍNA OBTIDA DA
PROTEÍNA DA FOLHA DE MANDIOCA, DA SOJA E DO SORO DE
QUEIJO

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Curso de Agroquímica,
para obtenção do título de “Magister
Scientiae”.

APROVADA: 26 de setembro de 1996.

Prof . Luiz C. G. de Miranda
(Conselheiro)

Prof^a . Neuza Maria Brunoro Costa
(Conselheira)

Prof^a . Tânia Toledo de Oliveira

Prof^a . Maria Eliana L. R. de Queiroz

Prof . Tanus Jorge Nagem
(Orientador)

AGRADECIMENTO

A Deus, pela força a mim concedida para vencer todos os obstáculos.

Especialmente aos meus pais, Luiz Carlos (*in memoriam*) e Maria de Arruda, por todo o carinho e pelo esforço para que tornasse possível esta minha caminhada.

Às minhas irmãs, pela convivência.

Ao Sérgio Pereira Braz, pelo apoio e pela compreensão.

À Heloisa Torres de Freitas e Lourdes de Souza Neta, pela ajuda e amizade.

À Mara Cafiero e Cíntia Chagas, pelo companheirismo e apoio.

Aos colegas do NIPA.

Ao professor Luiz Carlos Guedes de Miranda, pelo acompanhamento do trabalho, pelo estímulo e pela dedicação.

Ao professor Tanus Jorge Nagem, pela colaboração e orientação.

À professora Tânia Toledo de Oliveira, pela colaboração.

À professora Neuza Maria Brunoro Costa, pela atenção e valiosa colaboração.

Ao NIPA, Departamento de Química, Departamento de Nutrição e Saúde, Departamento de Veterinária e ao Bioagro, pela utilização de suas instalações e pelo material cedido.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

Eliana Carla Gomes de Souza, filha de Luiz Carlos Gomes de Souza e Maria de Arruda Gomes de Souza, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em dois de janeiro de 1969.

Concluiu o curso de segundo grau no Colégio Universitário em 1987, Viçosa, Minas Gerais.

Ingressou no curso de Nutrição em 1988, na Universidade Federal de Viçosa, onde se graduou em janeiro de 1993.

Em 1994, iniciou o curso de mestrado em Agroquímica, defendendo tese em 1996.

CONTEÚDO

	Página
EXTRATO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Proteína	4
2.2. Reação de plasteína	7
2.2.1. Fatores que influenciam a reação.....	8
2.2.2. Enzimas	11
2.2.3. Aplicações	13
2.3. Folha de mandioca	15
2.4. Soja	18
2.5. Soro de queijo	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Obtenção do isolado protéico de folha de mandioca	22
3.2. Obtenção do concentrado protéico de soro ultrafiltrado	25
3.3. Obtenção do isolado protéico de soja	25

3.4. Hidrólise e ressíntese de proteínas	26
3.4.1. Hidrólise	26
3.4.2. Ressíntese	26
3.5. Análises químicas e bioquímicas	27
3.5.1. Determinação do teor de proteína	27
3.5.2. Determinação da atividade de urease	27
3.5.3. Dosagem de minerais	28
3.5.4. Dosagem de aminoácidos	28
3.6. Avaliação biológica	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Obtenção das plasteínas	35
4.2. Teores protéicos	35
4.3. Atividade de urease	38
4.4. Teores de minerais	39
4.5. Análise de aminoácidos	44
4.6. Avaliação biológica	50
5. RESUMO E CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICE	61

EXTRATO

SOUZA, Eliana Carla Gomes . M.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 1997. *Caracterização Nutricional da Plasteína Obtida da Proteína da Folha de Mandioca, da Soja e do Soro de Queijo*. Professor Orientador: Tanus Jorge Nagem. Professores Conselheiros: Luiz Carlos Guedes de Miranda e Neuza Maria Brunoro Costa.

Com o objetivo de testar o aproveitamento de fontes protéicas de baixo custo (folha de mandioca, do soro de queijo e da soja) através da reação da plasteína, para obtenção de um produto com propriedades físico-químicas e nutricionais satisfatórias para fins na alimentação humana, foram preparados o isolado protéico de folha de mandioca (IPFM), o concentrado protéico de soro ultrafiltrado (CPSU) pelo processo de ultrafiltração e adquirido no mercado o isolado protéico de soja. O IPFM e o CPSU foram desengordurados após a obtenção. O IPFM, CPSU e o isolado protéico de soja (Proteimax- 90 HG) foram submetidos separadamente ao processo de hidrólise enzimática. Em seguida, foram misturados e submetidos ao processo de ressíntese enzimática, utilizando-se pancreatina em diferentes valores de pH para hidrólise e síntese. Durante as reações foram controlados temperatura, tempo de reação, pH e concentração da enzima e do substrato. Foram dialisados a

plasteína e o sobrenadante de plasteína. Os teores protéicos da plasteína precipitada e do sobrenadante de plasteína foram 52,6 e 72,0%, respectivamente, sendo o teor protéico do sobrenadante da plasteína superior ao do concentrado protéico de soro ultrafiltrado e do isolado protéico de folha de mandioca. Os resultados da atividade de urease demonstraram que houve destruição quase completa de todos estes fatores. Pode-se verificar que tanto as matérias - primas quanto os produtos obtidos podem ser considerados boas fontes de aminoácidos essenciais, principalmente para adultos e criança após o desmame. Os valores do Quociente da Eficiência Líquida Protéica (NPR) das plasteínas não diferiram estatisticamente dos apresentados pela caseína e o valor da Utilização Líquida da Proteína (NPU) da plasteína precipitada não diferiu estatisticamente da caseína e o do sobrenadante de plasteína foi inferior ao padrão de caseína. A plasteína precipitada e o sobrenadante de plasteína apresentaram valores de digestibilidade significativamente inferiores ($P < 0,05$) ao padrão, com adequação de 70,3 e 91,2%, respectivamente, em relação à caseína. A plasteína precipitada e o sobrenadante de plasteína são boas fontes de cobre e sódio e não são boas fontes de cálcio e potássio. A plasteína precipitada é boa fonte de ferro, manganês, magnésio e zinco, segundo recomendação do RDA (1989). Pode-se concluir que com a reação de plasteína, há uma melhoria na qualidade protéica de fontes alternativas.

ABSTRACT

SOUZA, Eliana Carla Gomes, M.S. Federal University of Viçosa, may, 1997.
Nutritional Characterization of the Plastein Obtained of the Protein of the Manioc Leaf, of the Soybean and Whey of Cheese. Adviser: Tanus Jorge Nagem. Committee Members: Luiz Carlos Guedes de Miranda and Neuza Maria Brunoro Costa .

With the objective to test the utilization of proteic source of low cost (manioc leaf, the whey of cheese and the soybean) through of the plastein reaction, to the obtention of the product with physical-chemistry and nutritional properties satisfactories in order at the human alimentation, were prepared the proteic isolated of manioc leaf (IPFM) and the concentrated of overfiltrated whey (CPSU) and the proteic isolated of soybean was adquired in the market. The IPFM and the CPSU were defatted after the obtention. The IPFM, CPSU and the proteic isolated of soybean (Proteimax-90 HG) were submitted separarely to the hydrolytic enzyme process. After that, they were mixed and submitted to the double synthesis enzyme process, utilizing pancreatin in values diferent of pH to the hydrolysis and synthesis. During the reactions, the temperature, the reaction time, pH and concentration of the enzyme and the substrate were controlled. The plastein and supernatant of plastein were dialysed. The proteic contend of the

precipitate plastein and the supernatant of plastein were 52,6 and 72%, respectively, and the proteic content of the supernatant of plastein superior to the protein concentrated of overfiltered whey and the proteic isolated of manioc leaf. The effects of the activity of urease demonstrated that had destruction almost complete of all that factors. Can be verified that as the raw material as the products obtained can be considerate good source of essentials amino acids, principally to the adults and the child after the wean. The values of the NPR of the plastein didn't differ statistically of the showed to the casein and the value of the NPU of the precipitated plastein didn't differ statistically of the casein and of the supernatant plastein was inferior to the casein pattern. The precipitated plastein and the supernatant plastein showed digestibility values significantly inferiores ($P < 0,05$) to the pattern, with adaptation of 70,3 and 91,2%, respectively, in relation to the casein. The precipitated plastein and supernatant plastein are good sources of copper and sodium and they aren't good sources of calcium and potassium. The precipitated plastein is good source of iron, manganese, magnesium and the zinc, according to the RDA recommendation (1989). Can be concluded that with the plastein reaction, there are a advance in the proteic quality of alternatives source.

1. INTRODUÇÃO

A desnutrição é um estado crônico de carência calórico-protéico, no qual o organismo apresenta desaceleração (casos leves), interrupção (casos moderados) ou retrocesso (casos graves) da evolução normal de seus parâmetros; bioquímicos (diluição), funcionais (disfunção com ênfase no desenvolvimento neuropsicomotor) e anatômicos (depleção, com ênfase no crescimento físico) (MARCONDES et al.,1976).

Admite-se que, no mundo, cerca de 2/3 da população de áreas em desenvolvimento sofre de desnutrição crônica, enquanto 1/5 subsiste em uma dieta constituída predominantemente por carboidratos (SOGORB et al., 1990).

A mucosa do intestino delgado, fígado e pâncreas, por apresentarem um intenso “turnover” protéico e constituírem, no organismo humano, um dos locais onde se processam intensos fenômenos de síntese, sofrem repercussões imediatas através da desnutrição, levando a uma acentuada diminuição de absorção de nutrientes. O déficit de absorção de proteínas, ainda que discreto, tem importante papel na desnutrição, pois pode agravar uma situação geral de depleção protéica já instalada (MARCONDES et al., 1976)

A utilização de hidrolisados protéicos para alimentação de população sadia ou em recuperação de indivíduos com variados graus de desnutrição tem

apresentado resultados mais satisfatórios que o uso de soluções de aminoácidos puros, pois, além de apresentarem taxa de absorção comparável, estes hidrolisados mostram menor osmolaridade, evitando o aparecimento de distúrbios digestivos (MARCHINI et al.,1985).

A grande expansão populacional e a baixa disponibilidade de alimentos protéicos para determinados grupos populacionais ocasionaram aumento do interesse pelo melhoramento de fontes protéicas convencionais e incentivou muito a pesquisa de fontes alimentares não-convencionais, visando aumentar a disponibilidade e a capacidade nutricional destes tipos de alimentos (MIRANDA et al., 1991).

Apesar de em muitos casos as novas fontes protéicas não se mostrarem aceitáveis por apresentarem alguns inconvenientes, como baixo valor nutricional, características sensoriais não-aceitáveis ou, ainda, propriedades tecnológicas deficientes na alternativa apresentada, com a reação de plasteína todos esses inconvenientes podem ser corrigidos, pois, é possível, pela reação de plasteína, manipular aminoácidos para a obtenção de um balanceamento satisfatório de aminoácidos essenciais, com mistura de hidrolisados protéicos e,ou, por incorporação de aminoácidos limitantes (PELÚZIO, 1993).

Pela reação de plasteína é possível ainda retirar aminoácidos indesejáveis, como no caso de obtenção de produtos com baixo teor de fenilalanina, usado para fins dietoterápicos, principalmente em portadores de fenilcetonúria (YAMASHITA et al., 1976a).

As características físicas do produto natural também podem ser modificadas, como, por exemplo, o aumento de solubilidade, que ocorre em virtude da incorporação de ácido glutâmico (YAMASHITA et al., 1975).

A reação de plasteína é conhecida como um processo enzimático de alongamento da cadeia polipeptídica, utilizando-se como substrato hidrolisados protéicos (BALDINI et al., 1983) .

A soja, quando bem processada, constitui a principal fonte de ingestão protéica, pois, apesar dos problemas de aceitação apresentados e pelos aspectos sensoriais, é rica em aminoácidos essenciais, tendo nos aminoácidos sulfurados os aminoácidos limitantes (TORÚN et al., 1981).

As proteínas do soro de queijo, que contêm altas concentrações de aminoácidos sulfurados e composição aminoacídica superior à da caseína no teor de aminoácidos essenciais (FORATO, 1994), também são de grande interesse como fonte protéica.

A folha de mandioca, com teor de proteína em torno de 20% na matéria seca e também rica em vitaminas e apresentando alto teor mineral, constitui outra alternativa como fonte não-convencional de proteínas.

A associação destas proteínas na forma de hidrolisados pode resultar um produto de boa digestibilidade, com alto valor biológico a custo relativamente baixo, possibilitando assim seu aproveitamento na alimentação humana.

O objetivo deste trabalho foi testar o aproveitamento de fontes protéicas de baixo custo (da folha de mandioca, do soro de queijo e da soja) pela reação da plasteína, para obtenção de um produto com propriedades físico-químicas e nutricionais satisfatórias para a alimentação humana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Proteína

As proteínas são polímeros de peso molecular elevado que contêm na molécula nitrogênio, além de carbono, hidrogênio e oxigênio e, freqüentemente, enxofre (SOLÁ, 1988). São as macromoléculas mais abundantes nas células vivas e constituem 50% ou mais de seu peso seco. Todas as proteínas, sejam das mais antigas linhagens de bactérias, sejam das formas de vida mais evoluídas, são construídas com o mesmo conjunto de 20 aminoácidos em seqüências características (LEHNINGER, 1990).

Os aminoácidos são classificados como essenciais e não-essenciais. Um aminoácido essencial é aquele que o organismo é incapaz de sintetizar e que, portanto, deve estar presente na dieta. Os inadequadamente chamados de não-essenciais podem ser sintetizados pelo organismo nas quantidades necessárias para seu funcionamento normal, entretanto, pela possibilidade de síntese a partir de outros aminoácidos ou fonte de nitrogênio, não são considerados essenciais à dieta (BODINSKI, 1993).

As proteínas são necessárias para prover o organismo de nitrogênio e aminoácidos, com os quais ele realiza a síntese de suas próprias proteínas. Esta é a sua principal função, pois a contribuição das proteínas no fornecimento

energético em condições normais oscila normalmente entre 11 e 13% do valor calórico total (SOLÁ, 1988). À medida que cresce o poder aquisitivo da população, a ingestão de proteínas tende a aumentar, elevando sua contribuição calórica (BODINSKI, 1993).

As proteínas são classificadas em simples, conjugadas e derivadas. Uma proteína simples é aquela que, quando hidrolisada, fornecerá como resultado somente aminoácidos ou seus derivados. A albumina e a globulina são exemplos de proteínas simples. Proteínas conjugadas são compostas por uma proteína simples e uma substância não-protéica e, como exemplos, têm-se as mucoproteínas e lipoproteínas. As proteínas derivadas não são mais que estágios da decomposição da molécula protéica e, como exemplo, têm-se as proteoses e peptonas. As proteínas são também classificadas de acordo com o seu valor nutricional. Uma proteína é completa quando contém todos os aminoácidos essenciais em quantidades suficientes para manter o balanço de nitrogênio e sustentar o crescimento ou quando possui alto valor biológico, ou seja, aquelas principalmente de origem animal (carne, ovos, leite), com exceção da gelatina e a globina do sangue, que, embora de origem animal, são incompletas. Proteínas incompletas são aquelas que não possuem quantidades suficientes de um ou mais aminoácidos essenciais (BODINSKI, 1993). Esses aminoácidos, quando escassos na proteína ou em quantidades insuficientes são chamados fatores limitantes. As proteínas de origem vegetal geralmente pertencem a essa categoria.

A solubilidade está relacionada com os tipos de aminoácidos que predominam na estrutura da proteína. Há proteínas ricas em aminoácidos com grupos R hidrofóbicos ou insolúveis em água, como fenilalanina, isoleucina, valina, metionina e alanina. As proteínas em que os grupos R hidrofóbicos são expostos à água são essencialmente insolúveis. Embora as proteínas globulares também possam conter muitos grupos R hidrofóbicos, a cadeia polipeptídica dessas proteínas dobra-se de tal forma que os grupos R hidrofóbicos situam-se no interior da conformação globular, evitando assim sua exposição à água, enquanto os grupos R polares, ou hidrofílicos, são expostos na superfície externa da

molécula protéica. As proteínas globulares, como a soroalbumina, são, por isso, geralmente solúveis em meios aquosos. (LEHNINGER, 1990).

A quase totalidade da proteína consumida pelo homem em sua alimentação é de origem animal e vegetal e somente pequena quantidade é proveniente das chamadas fontes não-convencionais, que são aquelas provenientes de microrganismos como bactérias cultivadas com o uso de derivados de petróleo como fonte de carbono; as leveduras provenientes da fermentação da sacarose para produção de etanol e de algas como as *Chlorellas* e os concentrados protéicos que podem ser obtidos das folhas de plantas, que também apresentam deficiências em um ou mais dos aminoácidos essenciais, podendo apresentar problemas nutricionais por estarem acompanhadas de substâncias tóxicas ou de inibidores de enzimas proteolíticas (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

O valor nutricional de uma proteína depende, em grande parte, do padrão e da concentração de aminoácidos essenciais para síntese de compostos nitrogenados no corpo. Este conceito constitui a base fundamental para os métodos de cálculo do valor nutritivo da proteína de um alimento. Em conseqüência, a qualidade da proteína pode variar com a quantidade e o padrão de aminoácidos requeridos (SGARBIERI, 1987)

O conteúdo de aminoácidos essenciais da alimentação deve ser de acordo com o padrão sugerido pelo Comitê FAO/OMS/UNU, 1985, que está embasado nas necessidades de aminoácidos essenciais dos pré-escolares, devendo ser usado como parâmetro para avaliar qualidade de proteínas da alimentação para todos os grupos, com exceção de crianças menores de um ano (VANNUCCHI et al., 1990).

Os métodos usados para avaliação da qualidade protéica podem ser químicos, biológicos ou microbiológicos, sendo os biológicos os mais utilizados (PELLET e YOUNG, 1980):

a) Químicos : baseiam-se, essencialmente, na análise dos aminoácidos da proteína em estudo e na comparação do perfil de aminoácidos essenciais, assim obtidos, com o de uma proteína-padrão.

b) Biológicos : os métodos biológicos utilizados para avaliação do valor nutritivo de uma proteína baseiam-se na resposta de um organismo à ingestão de uma proteína e são normalmente obtidos por experimentos com animais, realizados por diversas técnicas, como Quociente de Eficiência Protéica (NPR), Utilização Líquida da Proteína (NPU) e Digestibilidade.

C) Microbiológicos : baseiam-se na resposta de um microrganismo a um determinado aminoácido. Podem ser extremamente úteis quando não se dispõe de outro método ou quando se necessita determinar um único aminoácido em um grande número de amostras e não se dispõe de um método químico colorimétrico específico para este aminoácido.

2.2. Reação de plasteína

Em 1886, Danilewsky descobriu que quando o suco gástrico era adicionado a uma solução concentrada de hidrolisado protéico de alguma proteína uma solução opaca era formada após um tempo e, gradualmente, convertido em gel. Esse material formado foi denominado plasteína, sendo muito estudado até o final da década de 50, pois foi considerada um possível caminho de síntese protéica no organismo humano (BELIKOV e GOLOLOBOV, 1986).

Após a descoberta, em 1957, do processo de alongamento da cadeia polipeptídica “ in vitro”, a plasteína passou a ser de interesse somente em estudos de enzimologia (EDWARDS e SHIPE, 1978).

O interesse pela reação de plasteína aumentou novamente em 1970, após o reinício dos estudos por um grupo de pesquisadores japoneses, visando melhorar fontes protéicas convencionais e não-convencionais (BELIKOV e GOLOLOBOV, 1986), que não se mostravam aceitáveis por apresentarem alguns inconvenientes, como baixo valor nutricional, características sensoriais pouco aceitáveis ou propriedades tecnológicas deficientes (MIRANDA et al., 1991). De alguma forma esta reação possibilitava a utilização destas fontes para consumo humano, pois a reação da plasteína é capaz de corrigir os inconvenientes;

melhorar o perfil aminoacídico, através da incorporação de aminoácidos limitantes; melhorar aspectos sensoriais como aroma e sabor; melhorar características tecnológicas como solubilidade, poder emulsificante e capacidade de retenção de água.

Por ser a plasteína constituída de uma mistura de polipeptídios de alto peso molecular, sua estrutura assemelha-se à das proteínas desnaturadas, o que é caracterizado pela baixa solubilidade em água (ERIKSEN e FAGERSON, 1976; BELIKOV e GOLOLOBOV, 1986). Estudos utilizando difração de Raio-X revelaram que as plasteínas não apresentam estruturas secundárias e terciárias como as proteínas que as originaram, elas se assemelham àquelas obtidas pela clivagem por várias enzimas proteolíticas e sofrem também precipitação por agentes utilizados para proteína como ácido tricloroacético (BELIKOV e GOLOLOBOV, 1986).

A reação da plasteína é conhecida como um processo enzimático relacionado com o crescimento da cadeia peptídica, isto é, uma reação reversa à hidrólise de proteínas por proteases (BELIKOV e GOLOLOBOV, 1986).

A plasteína é geralmente obtida em duas etapas distintas. Na primeira, as proteínas extraídas são hidrolisadas parcialmente com enzimas proteolíticas específicas. Na segunda, o hidrolisado parcial sofre ressíntese ou alongamento enzimático. A utilização de enzimas específicas, a extensão da desnaturação da proteína utilizada como substrato, as concentrações das enzimas e dos substratos, o pH, a temperatura e a presença ou não de substâncias inibidoras são fatores que devem ser controlados para se obter uma plasteína de boa qualidade (ERIKSEN e FAGERSON, 1976).

2.2.1. Fatores que influenciam a reação

As condições necessárias para síntese mais efetiva de plasteína são diferentes das requeridas para a hidrólise protéica. A concentração elevada de

substrato, o baixo peso molecular do substrato e a pequena variação de pH são condições descritas por ARAI et al. (1975).

As concentrações ideais de substrato para as reações de síntese são, em média, de 30 a 50% (Tsai et al., 1974, citados por YAMASHITA et al., 1976b). PALLAVICINI e ZAMORANI (1978) consideraram como ideal a concentração na faixa de 30 a 40%. Alta concentração de substrato em relação ao sistema provoca decréscimo na concentração de água do sistema, o que favorece a reação de síntese (YAMASHITA et al., 1976b).

O peso molecular dos hidrolisados deve ser baixo, porque substratos de baixo peso molecular contêm maior quantidade de grupos amínicos e carboxílicos terminais disponíveis para a reação de síntese (ARAI et al., 1975). Segundo FUJIMAKI et al. (1970), o peso molecular médio do hidrolisado protéico deve ser inferior a 1.000 daltons. VARANINI et al. (1979) consideraram como ideal o peso molecular do substrato entre 500 e 600 daltons.

Em relação ao pH, o valor ótimo para síntese deve ser igual ou muito próximo ao ponto isoelétrico do substrato (pH de 4 a 6), independentemente da enzima usada para a síntese (VARANINI et al., 1979), enquanto a variação para o pH de hidrólise é bem maior (pH de 1 a 10), conforme a enzima utilizada (ARAI et al., 1975).

Muitos outros fatores parecem também contribuir para maior eficiência da reação.

A temperatura ótima, no caso das endopeptidases, está próxima a 37°C (ARAI et al., 1975), podendo variar de 37 a 50°C, de acordo com a temperatura ótima da enzima utilizada (PELÚZIO, 1993).

O tempo de incubação ideal para a reação de síntese pode variar de 24 a 96 horas (ARAI et al., 1975). PELÚZIO (1993) recomenda que o período de incubação possa variar entre 24 e 72 horas.

A produção de plasteína também é afetada pelo tempo de hidrólise do substrato e uma excessiva digestão pode produzir pequenos peptídios e aminoácidos livres que não teriam condições de aproveitamento na formação da

plasteína (EDWARDS e SHIPE, 1978). O tempo recomendado varia de 6 a 12 horas.

A proporção enzima/substrato pode variar de 1 a 3% (ARAI et al., 1975), porém, as relações enzima/substrato mais freqüentemente empregadas são de 1/100 e 1/200, segundo PALLAVICINI e ZAMORANI (1978).

Para se separar a plasteína formada dos outros produtos de peso molecular muito baixo utiliza-se a característica de insolubilidade das plasteínas em etanol ou acetona (FUJIMAKI et al., 1977).

YAMASHITA et al. (1976b) utilizaram um hidrolisado protéico de soja cujo grupo carbonílico foi marcado com ^{18}O , e verificaram que houve liberação de água durante a primeira hora de reação da plasteína. O resultado encontrado sugere que os peptídios podem reagir com a enzima para formar um complexo peptidil-enzima, intermediário, com liberação de água da carbonila terminal do substrato. O complexo peptidil-enzima pode ser, quase que simultaneamente, atacado por um agente nucleofílico, ao qual o grupo acil é transferido. Este agente nucleofílico pode ser a água, neste caso resultando em um processo de degradação ou outros agentes nucleofílicos, como aminogrupos ou peptídios, transformando-se, assim, em uma reação de condensação com alongamento da cadeia polipeptídica.

YAMASHITA et al. (1971 e 1976b) mostraram que, quando a mistura de hidrolisado protéico de soja e éster etil L- metionina eram incubados em presença de papaína, a plasteína obtida incorporava a metionina do éster. É também possível o preparo de uma plasteína solúvel em água partindo de hidrolisados de proteína de soja, quando ácido glutâmico era incorporado da mesma maneira (YAMASHITA et al., 1975).

Os processos de hidrólise geralmente utilizados são a hidrólise ácida e a enzimática. A ácida origina mistura de aminoácidos e peptídios de tamanho variado e é, geralmente, obtida com emprego de ácido clorídrico e com neutralização posterior. Essa neutralização é conseguida pela utilização de hidróxido de sódio, o que ocasiona aumento indesejável do teor de sal. A

hidrólise enzimática é recomendada por apresentar os inconvenientes em menor grau e, ainda, possibilitar o uso de enzimas comuns do trato gastrointestinal (MIRANDA et al., 1994). A reação de síntese é sempre por meio da utilização de enzimas.

O grau ou a extensão da degradação enzimática e o grau de desnaturação são importantes fatores que estão diretamente relacionados com o decréscimo da solubilidade em água. Quanto maior a desnaturação da proteína, mais insolúvel em água ficarão as moléculas protéicas. Entretanto, determinadas enzimas poderão degradar as proteínas em seus monômeros solúveis em água, ocorrendo índices máximos de degradação protéica quando a concentração do substrato é alta o bastante para combinar com todas as moléculas da enzima em solução (FUJIMAKI et al., 1977).

Os hidrolisados protéicos altamente hidrofílicos não são substratos eficientes, porque o produto estará solúvel e será eliminado com dificuldade do sistema de reação. Por outro lado, os hidrolisados protéicos altamente hidrofóbicos são também ineficientes, porque o produto será facilmente precipitado antes do crescimento suficiente do peptídeo (ASO et al., 1974).

2.2.2. Enzimas

ARAI et al. (1976), em um experimento, utilizou alga (*Spirulina maxima*) para a reação da plasteína como substrato e combinou duas enzimas diferentes; uma para a hidrólise e outra para a ressíntese. Para a hidrólise protéica utilizou pepsina e, para síntese, a papaína. Esta combinação foi eficiente para remoção de impurezas não-protéicas (pigmentos fotossintéticos e flavor) e para melhorar nutricionalmente o substrato.

Segundo FUJIMAKI et al. (1970), a enzima mais eficiente para produção de plasteína é α -quimotripsina, seguida por duas enzimas microbianas comerciais (Biopraxe e Prozime). As endopeptidases tripsina, pepsina, bromelina e papaína e algumas exopeptidases são também utilizadas, porém, com menor eficiência. A

pepsina, tripsina, aspergillopeptidase A, molsina e rapidase não são eficazes na retirada do sabor amargo da plasteína.

MIRANDA et al. (1991) prepararam plasteína com caseína e proteína isolada de soja, usando pancreatina como enzima de hidrólise e síntese. O rendimento encontrado foi de 60%, semelhante ao de PALLAVICINI et al. (1980), que usaram proteína de soja e de gramíneas, pepsina na hidrólise e α -quimotripsina na síntese, sendo superior ao de VARANINI et al. (1979), que empregaram proteína de soja como substrato, pepsina na hidrólise e papaína e α -quimotripsina na síntese.

Segundo ARAI et al. (1975), os substratos e as enzimas mais usadas para a reação da plasteína foram a proteína de soja, a pepsina, como enzima para hidrólise, e α -quimotripsina e a papaína, como enzimas para síntese.

O uso de uma única enzima no processo de hidrólise e síntese, em diferentes pHs, parece aumentar o rendimento da reação de plasteína, além de diminuir o teor salino do produto (MIRANDA et al., 1991).

Existem problemas nos estudos da inativação enzimática para as propriedades funcionais da plasteína, tais como a eliminação ou inativação da enzima ao final do tratamento. Na inativação conseguida pelo uso do calor, a proteína pode ser desnaturada e insolubilizada. Na “lavagem” da enzima por insolubilização no ponto isoelétrico da proteína, pode ocorrer perda de porções de proteínas que ainda podem estar solubilizadas. Na inativação pelo método químico, podem também aparecer mudanças significativas na proteína, não sendo, tal método recomendado em alimentos. Do ponto de vista prático, para aplicação em alimentos, parece ser o tratamento térmico a melhor opção, não somente para a inativação da enzima, como também para redução da contaminação microbiológica (PUSKI, 1975).

2.2.3. Aplicações

Muitos trabalhos têm mostrado o uso da reação de plasteína para enriquecer proteínas com aminoácidos.

YAMASHITA et al. (1971), com objetivo de suplementar a proteína de soja, utilizaram como fonte fornecedora de cisteína a queratina do cabelo e, como fonte fornecedora de metionina, a ovalbumina, tendo usado também a L-metionina, além de seus derivados. Houve incorporação de aminoácidos originários de fontes protéicas naturais. Quanto à metionina, esta foi incorporada na forma de derivados, principalmente quando estes estavam sob a forma de ésteres de L-metionina e L-metionil-L-metionina. Quanto à adição de L-metionina pura, não houve incorporação da mesma no produto final.

ASO et al. (1974), aplicando a reação da plasteína, visando melhorar o valor nutricional da proteína do milho, e usando ésteres dos seguintes aminoácidos essenciais, triptofano, treonina e lisina, obtiveram como resultados a incorporação desses aminoácidos à proteína obtida.

A síntese de plasteína foi também aplicada para preparar material dietético com controle do padrão de aminoácidos. Pela reação de plasteína foi possível retirar aminoácidos indesejáveis, modificando a composição aminoacídica da proteína como no caso de obtenção de produtos com baixo teor de fenilalanina, que podem ser usados para fins dietoterápicos, sendo indicados para uso em portadores de fenilcetonúria (YAMASHITA et al., 1976a, 1976b).

MIRANDA et al. (1991) preparam plasteína por meio da proteína da soja e caseína, usando a pancreatina como enzima de hidrólise e de ressíntese, visando obter melhorias quanto aos fatores nutricionais. O produto obtido mostrou que houve incorporação de triptofano, metionina e lisina, boa digestibilidade e alto valor biológico.

Algumas proteínas, como as de soja, apresentam, por estarem ligadas à determinados compostos, odores característicos que podem interferir em sua aceitação pelo consumidor. A reação da plasteína, pode ser útil, pois a proteólise

péptica mostra-se efetiva na desodorização, diminuição dos teores lipídicos e promovendo a descoloração da proteína da soja. A remoção do cheiro e o sabor desagradável da proteína de soja pela reação de plasteína utilizando aminopeptidases ou carboxipeptidases que liberam as substâncias aderentes causadoras do “flavor” indesejável no alimento, através da hidrólise enzimática e de extração destes componentes com éter. Estes sabores estranhos derivam de componentes químicos ligados à proteína como aldeídos (acetaldeído, hexanal, heptanal), álcoois (metanol, etanol, hexanol), fenóis (4-vinil guaiacol) e cetonas (etil-vinil cetona), entre outros e de efeitos prejudiciais nas condições de armazenagem e processamento sobre estes componentes, restando a hidrólise enzimática para sua eliminação (FUJIMAKI et al.,1970).

A plasteína é pouco solúvel, o que é indesejável no processo de enriquecimento de bebidas, sopas e confeitaria. A solubilidade em água está relacionada com o conteúdo de aminoácidos hidrofílicos. A reação da plasteína foi utilizada para enriquecimento de proteínas com ácido glutâmico, aumentando assim sua solubilidade em água (YAMASHITA et al., 1975).

As propriedades funcionais de proteína de soja foram modificadas quando esta foi tratada com protease de *Aspergillus oryzae*, havendo aumento do nitrogênio solúvel, da capacidade de emulsificação, de absorção de água e da espumabilidade. A viscosidade e estabilidade de emulsão diminuíram (PUSKI, 1975).

De acordo com Hofsten, citado por ERIKSEN e FAGERSON (1976), a plasteína podia ser proveitosa para as seguintes aplicações: remoção do sabor amargo dos hidrolisados; preparo de produtos gélicos com excelentes propriedades, incorporação em diferentes tipos de alimentos; preparo de produtos com melhor composição aminoacídica usando misturas de hidrolisados como substratos; preparo de produto com alto nível de um único aminoácido que pode ser usado como suplemento dietético em certos alimentos; preparo de tipos especiais de peptídeos solúveis tendo o flavor e outras características aceitáveis.

PELÚZIO (1993) trabalhou com proteína de folha de mandioca e caseína como substratos para a síntese de plasteína, obtendo bons resultados e chegando à conclusão que se pode usar fontes protéicas não-convencionais ou de baixo valor que biológico que podem ser suplementadas por fontes protéicas convencionais, pela reação de plasteína.

Utilizando proteína de soro de queijo ultrafiltrado e proteína de soja como substratos para síntese de plasteína, FORATO (1994) obteve melhoria do valor nutricional destas fontes protéicas.

2.3. Folha de mandioca

É reconhecido que grande quantidade de subprodutos agrícolas, principalmente a parte aérea de plantas, das quais são utilizados os tubérculos e as raízes, pode ser utilizada como fonte de proteínas não-convencionais. No entanto, sabe-se que proteínas de folhas e outras fontes protéicas não-convencionais não podem ser utilizadas “in natura” na alimentação humana por apresentarem problemas de propriedades funcionais, toxicidade, digestibilidade, qualidade nutricional e propriedades sensoriais (PELÚZIO, 1993).

As razões que justificam maior esforço no cultivo das culturas folhosas e no fracionamento de algumas delas, desde que o processo seja considerado econômico, são : as folhas são potencialmente a mais abundante fonte de proteínas; a proteína da folha, se não sofrer dano algum durante o processamento, terá um bom valor nutritivo; mesmo as tóxicas e pouco palatáveis podem ser usadas; o resíduo fibroso, contendo ainda certa quantidade de proteína não-extraída, pode ser usado como alimento para ruminantes (Pieri, 1983 citado por CHAVES, 1987).

Conhecida pela rusticidade e pelo papel social que desempenha nas populações de baixa renda, a cultura da mandioca tem grande adaptabilidade aos diferentes ecossistemas, o que possibilita seu cultivo praticamente em todo o mundo. O Brasil é o maior produtor de mandioca do mundo. Ressalta-se que os maiores produtores de mandioca do mundo, com produção acima de 2.000.000 t,

são os chamados países em desenvolvimento ou do terceiro mundo, caracteristicamente pobres, o que induz ser esta cultura uma cultura de subsistência, sem valor comercial significativo em termos mundiais (NETO, 1987).

A folha de mandioca apresenta em certas épocas do ano, no período seco, que ocorre em geral do 8^o ao 12^o e 16^o a 20^o mês após o plantio, alto teor de proteínas, em torno de 20% (base seca). O terço superior da planta reserva mais amido em detrimento do teor protéico, enquanto no período chuvoso (novembro a março), ou seja, do 12^o e 16^o mês, as plantas, por estarem mais enfolhadas, apresentam maiores teores protéicos. Neste período, o teor de tanino total é alto, mas as formas poliméricas apresentam-se com teores relativamente baixos, não suficientes para exercerem efeito depressor na digestibilidade protéica. É sabido que as proteínas das folhas e da parte aérea da mandioca apresentam boa qualidade, ou seja, um bom perfil aminoacídico, com deficiência apenas em alguns aminoácidos sulfurados, principalmente metionina, e com teores elevados de lisina. Os altos teores de lisina possibilitam a formulação de dietas nas quais a parte aérea entra como suplementadora de aminoácidos dos cereais, visando à obtenção de melhor qualidade protéica (CARVALHO e KATO, 1987).

Yeoh e Chew (1976) e Montaldo (1977), citados por CARVALHO e KATO (1987), comparando a composição em aminoácidos das folhas e da parte aérea da mandioca com capim-elefante, capim-guiné e soja, registraram superioridade da folha da mandioca em relação à maioria dos aminoácidos essenciais nas demais culturas testadas.

RAVIDRAN e RAVIDRAN (1988), analisando a composição nutricional da folha de mandioca, notaram algumas variações quando estas folhas eram separadas de acordo com o estágio de maturidade (muito jovem, jovem, madura). Com a maturidade, decresceram os valores de proteínas, de carboidratos e de minerais como K, Mg, P, Zn, e Mn, porém verificou-se aumento nos conteúdos de Ca, Na, Fe e fibras. A análise de aminoácidos revelou que as folhas jovens de mandioca são ricas em aminoácidos essenciais, exceto metionina e fenilalanina.

Após maturação, há tendência de diminuição na concentração destes aminoácidos. Todavia, observaram aumento do ácido glutâmico, prolina e glicina, permanecendo inalterados os teores de valina e fenilalanina.

FRANCO (1987) determinou a composição química da folha de mandioca, encontrando 7% de proteína, 18,3% de glicídio e 1% de lipídio.

A baixa qualidade nutricional de certos concentrados protéicos de plantas tem sido atribuída, em muitos casos, à presença de inibidores de enzimas proteolíticas, e a constituintes tóxicos como a fito-hemaglutinina ou, ainda, à deficiência de aminoácidos essenciais. ROMERO e BARATTA (1987) testaram o concentrado protéico puro na dieta de ratos, resultando em perda de peso dos animais. Utilizando concentrado protéico de folha de mandioca e caseína para formar plasteína, o mesmo autor notou que houve um aumento no conteúdo de proteínas de 47 para 90% e, ainda, que o concentrado protéico da folha de cor parda, sabor amargo e adstringente, além de baixa solubilidade em água, apresentava, após a preparação da plasteína, sabor suave, coloração creme, mantendo baixa solubilidade em água e resultados mais satisfatórios quanto à concentração protéica, qualidade biológica da proteína, quantidade de tanino, ácido cianídrico e inibidores enzimáticos (ROMERO e BARATTA, 1987).

PALLAVICINI et al (1980) utilizaram proteínas de folhas de alfafa e de grama (*Festuca pratensis*, Mibra) como substrato, e quimotripsina imobilizada em quitina como agente de hidrólise e ressíntese para preparação e obtenção da plasteína, que, quando comparada à outra, utilizando as mesmas substâncias em solução, não apresentava diferenças entre os produtos formados.

PELÚZIO (1993) utilizou folha de mandioca e caseína como substratos para síntese de plasteína e verificou que o isolado protéico de folha de mandioca apresentou teor protéico de 52%, o sobrenadante de plasteína com 64% e a plasteína precipitada 61%. O NPR do isolado protéico de folha de mandioca foi 0,75; o NPU foi 9,55 e a digestibilidade foi 61,86. Foi observado aumento desses valores para o sobrenadante e precipitado de plasteína, o NPU foi 3,86 e 3,61, os valores de NPR foram 53,41 e 53,02 e a digestibilidade, de 83,57 e 97,41,

respectivamente. O perfil aminoacídico das plasteínas apresentava-se superior em quase todos aminoácidos essenciais, com relação ao IPFM. Grande melhoria pode ser notada, principalmente no valor do ácido glutâmico, com 60% de aumento em relação ao isolado, e na tirosina, obtendo-se valor superior ao padrão caseína.

2.4. Soja

Dentre os alimentos de origem vegetal produzidos no Brasil, a soja ocupa o quinto lugar em volume de produção. O desenvolvimento de pesquisas com a soja tem propiciado aumento gradativo do uso dessa leguminosa e a indústria brasileira passou a utilizar vários de seus subprodutos, principalmente em alimentos formulados de uso institucional, pois a combinação da soja com outras matérias-primas, especialmente cereais, forma uma proteína de boa qualidade protéica, completa em aminoácidos, que transforma alimentos essencialmente calóricos em produtos calórico-protéicos (PEREIRA e CAMPOS, 1981).

A soja é um exemplo de matéria-prima com características de sabor e aroma indesejáveis no produto final. Esses sabores estranhos derivam de componentes químicos existentes na soja e das condições de processamento e estocagem sobre esses componentes. Quando a farinha de soja é aquecida, desenvolve-se um sabor específico de “feijão cru”, o que é atribuído à deterioração oxidativa de resíduos lipídicos sob a influência de lipoxigenases (BALDINI et al., 1983).

A soja é rica em aminoácidos essenciais, assemelhando-se às proteínas de origem animal, portanto, deficiente em aminoácidos sulfurados que são limitantes (TORÚN et al., 1981).

Segundo MIRANDA et al., 1991, a soja crua *Enrei nagano* contém 38% de proteína, 17% de lipídios, 8,6% de umidade e 4,4% de cinzas.

A utilização mundial de proteínas de plantas, especialmente proteínas de soja, é antiga. O isolado protéico de soja é conhecido comercialmente desde 1959. Com a melhoria da tecnologia de produção de proteína de soja e sua utilização, juntamente com o aumento nos custos de produtos protéicos

convencionais, a demanda pelas proteínas vegetais tem aumentado enormemente desde a década de 70 (PUSKI, 1975).

Os isolados protéicos de soja são de grande aplicação na indústria de alimentos. Esses isolados contêm entre 92 e 96% de proteínas na matéria seca e composição aminoacídica deficiente em aminoácidos sulfurados com uma soma de aminoácidos essenciais superior ao valor da proteína-padrão da FAO/WHO(1973).

FORATO (1994), trabalhando com isolado protéico de soja e concentrado protéico de soro ultrafiltrado como substrato para síntese de plasteína, observou que os produtos apresentaram composição intermediária entre os dois hidrolisados que os originaram, com aumento no teor de aminoácidos sulfurados, que se apresentam em baixos teores no isolado protéico de soja e, ainda, segundo ARAÚJO (1984), o tratamento térmico do isolado protéico de soja foi eficiente para inativação de substâncias antinutricionais como inibidores de tripsina, além de lipoxigenases e hemaglutininas evidenciados por medida da atividade de urease.

MIRANDA et al (1991), utilizando isolado protéico de soja e caseína como substrato para síntese de plasteína, obtiveram plasteína precipitada e do sobrenadante de plasteína com teores protéicos de 71,17 e 63,70%. Os valores de triptofano, metionina e lisina disponível foram baixos, porém, dada a natureza do produto, havia possibilidade de incorporação destes e de outros aminoácidos aos peptídios formados. Verificaram ainda que houve maior atividade do inibidor trípico na proteína isolada de soja, com decréscimo nos demais produtos. Para o hidrolisado de proteína de soja, isso pode ser explicado pelo processo de hidrólise, com aquecimento a 70⁰ C durante 10 minutos para inativação da enzima ou, ainda, pela própria ação proteolítica da pancreatina sobre o inibidor trípico.

2.5. Soro de queijo

Da fabricação de queijo resulta um líquido amarelo-esverdeado que é o soro. Para cada litro de leite coagulado para fabricação de queijo, são produzidos

de 0,6 a 0,9 litros de soro. Estima-se que em 1986, somente nas indústrias registradas no Serviço de Inspeção Federal (SIF) foram produzidos aproximadamente 11.501 toneladas de soro, sendo apenas cerca de 2,13% deste total industrializado, visando à produção de soro em pó (RIBEIRO,1989).

No Brasil, a disponibilidade de soro tem aumentado significativamente, estando atualmente estimada em 1,2 milhão de toneladas de proteínas, se houvesse um aproveitamento integral (VIEIRA e NEVES, 1985).

O soro é geralmente descartado “in natura” em córregos e mananciais e esta descarga pode provocar a destruição da flora e da fauna em razão da alta demanda biológica de oxigênio (DBO), que é da ordem de 30.000 a 40.000 mg de O₂ / litro de soro. Este produto nobre é quase totalmente desperdiçado e, considerando seu teor em proteínas solúveis ricas em aminoácidos essenciais e a presença de grande número de vitaminas do complexo B, poderia ser processado para utilização na alimentação humana e de animais (RIBEIRO, 1989).

As proteínas do soro contêm, na maioria das vezes, concentrações mais altas de aminoácidos essenciais que a caseína. A caseína é ligeiramente deficiente em aminoácidos sulfurados, enquanto as proteínas do soro possuem um excedente em relação à proteína-padrão da FAO (1973) desses aminoácidos. As proteínas do soro de queijo são excepcionalmente ricas em lisina e triptofano, bem equilibradas em cisteína, que é precursor da metionina. Em termos nutricionais , sua qualidade é superior à da caseína (ADRIAN, 1973).

No leite, aproximadamente 80% do nitrogênio está na forma de caseína e 20% é perdido no soro: cerca de 15% na forma de proteínas do soro e o restante como nitrogênio não-protéico (CONDACK, 1992).

BIRMAND et al. (1984) determinaram a composição do soro de queijo em pó, 11% de proteína, 0,20% de lipídios , 77% de glicídios, 5 % de umidade, 7% de cinzas e 0,06% de fibras.

Uma opção para concentrar as proteínas do soro, viabilizando seu aproveitamento, é a ultrafiltração, que pode ser definida como uma separação

soluto-solvente por meio de uma membrana seletiva adequada por aplicação de pressão hidrostática (BEATON, 1979).

No soro, a água e solutos como lactose, sais solúveis e nitrogênio não-protéico atravessam a membrana e são recolhidos numa solução denominada “permeado”. Gordura, proteína e sais insolúveis são retidos e constituem o “concentrado” (CONDACK, 1992).

Segundo FORATO (1994) a composição química do concentrado protéico do soro ultrafiltrado é a seguinte: 4% de umidade, 65% de proteína, 15 % de lipídios, 13% de lactose e 3 % de cinzas.

FORATO (1994), utilizando concentrado protéico de soro ultrafiltrado (CPSU) e caseína como substrato para síntese de plasteína, observou que o CPSU apresentou, NPU e NPR superiores ao da caseína e digestibilidade não diferindo estatisticamente. Concluindo, porém, que a proteína do soro do leite é de excelente qualidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios do NIPA (Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa Aplicada), no laboratório de Bioquímica do Departamento de Bioquímica, no laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde e no laboratório de Físico-Química do Departamento de Química, UFV.

3.1. Obtenção do isolado protéico de folha de mandioca

Foram utilizadas folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) da variedade Cacau Branco, cultivadas em canteiros experimentais do Departamento de Fitotecnia da UFV. As folhas colhidas em mesma época, aleatoriamente, das plantas nas regiões basal, mediana e apical com pecíolo foram em seguida acondicionadas em sacos plásticos para transporte. No laboratório, foram lavadas, picadas e colocadas em copo de liquidificador com água destilada na proporção de 1:10 (p/v) e trituradas por cinco minutos.

Em seguida, a parte fibrosa foi separada por coagem em dessorador de náilon e descartada. Ao volume final obtido do líquido de coagem foi adicionado HCl 0,1mol/l , até pH entre 4 e 5, que é o ponto isoelétrico, para precipitação das

proteínas. O líquido foi centrifugado sob refrigeração, 0 a 5⁰C, por quinze minutos, a 10.240 g, e o precipitado foi separado e seco em estufa a 70⁰C, por 48 horas.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado desidratado foi acondicionado em cartuchos de papel, colocado em aparelho de Soxhlet , onde foi submetido à lavagem com acetona/álcool na proporção de 1:1, para despigmentação e desengorduramento. A seguir, foi seco à temperatura ambiente por 4 horas e, posteriormente, em estufa com circulação de ar forçado, a 50⁰C, por 12 horas. Após, foi triturado em moinho de navalha para homogeneização do isolado e acondicionado em frasco de vidro com tampa rosqueável e guardado em geladeira para posterior hidrólise enzimática.

O procedimento para obtenção do isolado protéico da folha de mandioca está ilustrado na Figura 1.

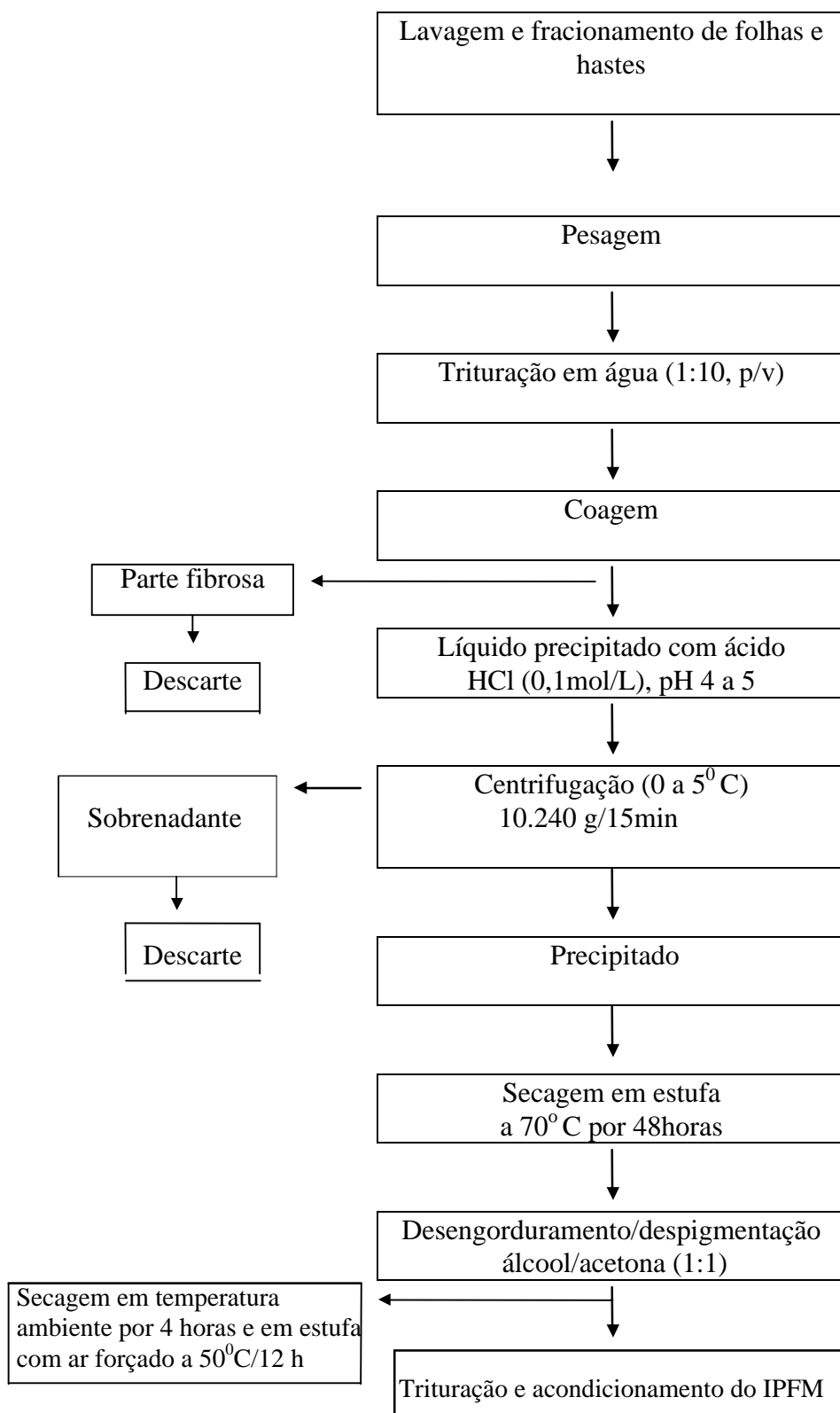


Figura 1 - Sequência de extração do isolado protéico da folha de mandioca

3.2. Obtenção do concentrado protéico de soro ultrafiltrado em pó

A ultrafiltração foi realizada nas instalações da Indústria de Laticínios Cotochés, no município de Rio Casca, Minas Gerais.

Pelo processo de ultrafiltração, foram obtidos 100 litros de concentrado a partir de um volume inicial de 1.000 litros.

Para diminuição do teor de lactose e evitar a ocorrência da reação de Maillard, foi feita a diafiltração, sendo o concentrado diluído para 1.000 litros com água destilada e novamente ultrafiltrado e concentrado para 100 litros.

A ultrafiltração foi realizada em sistema contínuo. A membrana utilizada foi do tipo polissulfônica de conformação espiral, com valor de corte de 6.000 Daltons.

A secagem do concentrado foi feita por “spray drying”.

3.3. Obtenção do isolado protéico de soja

O isolado protéico de soja, Proteimax 90 HG SANRIG, foi fabricado e adquirido da SAMBRA.

3.4. Hidrólise e ressíntese de proteínas

3.4.1. Hidrólise

O concentrado protéico da folha de mandioca , Proteimax-90 HG (isolado protéico de soja) e concentrado protéico de soro ultracentrifugado foram submetidos separadamente à hidrólise enzimática pela adição de uma quantidade conhecida do material a uma solução-tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0, na proporção 1:10 (p/v) , e adicionado de pancreatina na concentração de 5% em relação ao teor de proteína utilizada.

Após um período de seis horas de incubação, a 37 °C, sob agitação, a enzima foi inativada por aquecimento a 70 °C , por 10 minutos, em banho-maria (PUSKI , 1975). A mistura foi centrifugada, sob refrigeração (0 a 10 °C), por 20 minutos, a 10.240 g, obtendo-se no sobrenadante os hidrolisados, os quais foram congelados, liofilizados e acondicionados em frascos de vidro com tampa rosqueável e guardados em geladeira para serem submetidos ao processo de ressíntese.

3.4.2. Ressíntese

Os hidrolisados foram misturados na proporção de 2:2:1 (isolado protéico de soja/concentrado protéico de soro ultrafiltrado/isolado protéico de folha de mandioca) e dissolvidos na proporção de 40% (p/v) com uma solução - tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,0, onde foi adicionada pancreatina na proporção de 2% em relação ao teor de proteína utilizada. A mistura foi incubada a 24 °C, sem agitação, por 24 horas, aquecida a 70 °C em banho-maria por 10 minutos para

interromper a reação e em seguida centrifugada sob refrigeração (0 a 10 °C), por 20 minutos, a 10.240 g.

O sobrenadante obtido da centrifugação foi passado pela membrana de diálise Spectrapor 2^{7/8} IN (73mm) 3787-F67; o precipitado foi dissolvido em água destilada em volume igual do sobrenadante e, posteriormente, colocado no mesmo tipo da membrana de diálise. As membranas foram colocadas em recipiente com volume aproximado de 5 litros de água destilada e deionizada em geladeira com agitação manual ocasional por 24 horas, sendo realizada troca da água de 4 em 4 horas. O sobrenadante e o precipitado dialisados foram novamente congelados e liofilizados, obtendo-se, assim, a plasteína precipitada e o sobrenadante de plasteína (YAMASHITA et al., 1970).

3.5. Análises químicas e bioquímicas

3.5.1. Determinação do teor de proteína

Foram determinados os teores de proteínas do isolado protéico de soja (Proteimax- 90 HG), do concentrado protéico de soro ultracentrifugado (CPSU) , do isolado protéico de folha de mandioca, da plasteína precipitada e do sobrenadante de plasteína pelo método Kjeldahl , semimicro (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - A.O.A.C., 1984).

3.5.2. Determinação da atividade de urease

As atividades de urease foram determinadas, na plasteína precipitada e no sobrenadante da plasteína, como um indicativo de inativação de fatores

antinutricionais, pois a temperatura de inativação da urease é semelhante a dos fatores antinutricionais (IDROGO, 1984).

3.5.3. Dosagem de minerais

Foram determinados os minerais das amostras de plasteína precipitada e do sobrenadante de plasteína. Sendo a determinação de sódio e potássio feita por fotometria de chama, e a dos demais minerais(cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês e zinco) por absorção atômica (A.O.A.C., 1984).

3.5.4. Dosagem de aminoácidos

As amostras de sobrenadante de plasteína e de plasteína precipitada foram submetidas a hidrólise utilizando ácido clorídrico 6N, sob atmosfera de N₂, a 110⁰ C, durante 24 horas, no interior de ampolas de vidro hermeticamente fechados. Após a evaporação a vácuo dos hidrolisados, até a secura, os resíduos foram dissolvidos em tampão de sódio, 0,2N, pH 2,2, que continha norleucina como padrão interno. A determinação dos aminoácidos foi realizada, quantitativamente, por cromatografia de troca iônica, conforme SPACKMAN e STANFORD (1958) em analisador automático de aminoácidos BECKMAN, modelo 121.

3.6. Avaliação biológica da qualidade protéica

Para se avaliar a qualidade da proteína das plasteínas, foi conduzido um ensaio biológico, com 24 ratos machos (*Rattus norvegicus*), variedade albinus, da raça Wistar, recém-desmamados, com 24 dias de idade. Os animais foram distribuídos em quatro grupos de seis, de modo que a diferença do peso médio

para cada grupo não ultrapassasse 10g (A.O.A.C.,1984). Os ratos foram colocados em gaiolas individuais, recebendo água e alimento “ad libitum”, à temperatura ambiente variando entre 20 e 24 °C e com iluminação controlada com 12 horas de luz e 12 horas de escuridão por um período de quatorze dias.

As dietas experimentais continham teores protéicos que variaram de 9,08 a 9,85% , atendendo às recomendações preconizadas por PELLET e YOUNG (1980), de se fornecer na dieta entre 9 e 10% de proteína. Vitaminas e minerais foram acrescentados às dietas, suprimindo as exigências nutricionais dos animais, de acordo com o REPORT OF THE AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977).

Um grupo de animais recebeu a dieta-padrão de caseína, outro grupo recebeu dieta aprotéica e os outros dois grupos receberam dietas contendo plasteína ou sobrenadante de plasteína como fontes de proteína. A composição das dietas experimentais e seus respectivos estão mostrados nos Quadros 1, 2 e 3.

Quadro 1 - Composição das dietas experimentais

Ingredientes	Dietas (g/100g de dieta)			
	I	II	III	IV
Caseína	15,93	-	-	-
P ¹	-	-	17,10	-
SP ²	-	-	-	14,53
Mist. Mineral ³	3,50	3,50	3,50	3,50
Mist. Vitamínica ⁴	1,00	1,00	1,00	1,00
Cloreto de Colina	0,20	0,20	0,20	0,20
Óleo de Soja	5,00	5,00	5,00	5,00
Amido de Milho	74,79	90,30	73,71	75,91
TOTAL	100,42	100,00	100,51	100,14
Proteína (%)	9,08	-	9,64	9,85

¹ Plasteína precipitada

² Sobrenadante de plasteína

³ Ver Quadro 2

⁴ Ver Quadro 3

Quadro 2 - Mistura vitamínica¹

Ingredientes	Quantidade em 100 g
Tiamina. HCl	600,0 mg
Riboflavina	600,0 mg
Piridoxina	700,0 mg
D-Pantotenato de Cálcio	1,6g
Ácido Nicotínico	3,0 g
Ácido Fólico	200,0 mg
D-Biotina	20,0 mg
Cianocobalamina	1,0mg
Retinil Palmitato	400.000 ER
DL-Alfa Tocoferol Acetato	5.000 ET
Colicalciferol	2,5 mg
Menaquinona	5,0 mg
Excipiente (amido de milho q.s.p.)	1.000,0 g

¹ REPORT OF THE AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977)

q.s.p. quantidade suficiente para

ER 1 μ g de retinol ou 6 μ g de β -caroteno

ET 1 mg de d- α tocoferol

Quadro 3 - Mistura mineral¹

Ingredientes	g/1000 g
Fosfato de Cálcio Dibásico	500,00
Cloreto de Sódio	74,00
Citrato de Potássio Monoidratado	220,00
Sulfato de Potássio	52,00
Óxido de Magnésio	24,00
Carbonato Manganoso	3,50
Sulfato Manganoso	4,00
Citrato Férrico	6,00
Carbonato de Zinco	1,60
Carbonato Cúprico	0,30
Iodato de Potássio	0,01
Selenito de Sódio	0,55
Excipiente (amido de milho q.s.p.)	1.000,00

¹ REPORT OF THE AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (1977)

q.s.p. quantidade suficiente para

Foram utilizados dois métodos biológicos para avaliação da qualidade de proteína das rações: Quociente de Eficiência Líquida Protéica (NPR) e Utilização Líquida da Proteína (NPU).

O NPR é resultado de uma modificação do Quociente de Eficiência Protéica (PER) e consiste em somar ao ganho de peso do grupo experimental a perda de peso de um grupo que recebeu a dieta aprotéica, conforme BENDER e DOELL (1957).

A relação que permite o cálculo do NPR é a seguinte:

$$\text{NPR} = \frac{\text{GPGE(g)} + \text{PPGA(g)}}{\text{PCGE(g)}}$$

em que

GPGE = ganho de peso do grupo experimental ;

PPGA = perda de peso do grupo aprotéico;

PCGE = proteína consumida pelo grupo experimental.

O método descrito por MILLER e BENDER (1955) para a determinação da Utilização Líquida da Proteína (NPU) consiste em medir a porcentagem do nitrogênio ingerido que foi retido pelo organismo.

A relação que permite o cálculo do NPU a partir do nitrogênio da carcaça é assim mostrada :

$$\text{NPU} = \frac{\text{NCGE} - \text{NCGA}}{\text{NCGE}}$$

em que

NCGE = nitrogênio corporal do grupo experimental;

NCGA = nitrogênio corporal do grupo aprotéico;

NCGE = nitrogênio consumido pelo grupo experimental

A digestibilidade é a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas na forma de aminoácidos (SGARBIERI , 1987).

A digestibilidade verdadeira é definida como a porcentagem absorvida do nitrogênio consumido, levando-se em consideração o nitrogênio fecal endógeno (SGARBIERI, 1987).

A digestibilidade foi determinada do 7^o ao 14^o dia de experimento, com as dietas marcadas com carmim a 0,2%. As fezes foram coletadas diariamente e mantidas sob refrigeração. Posteriormente, submetidas à secagem, por 24 horas, a 105°C, e moídas em moinho de navalha, quando se determinou o teor de nitrogênio. O grupo de animais que recebeu a dieta aprotéica permitiu a determinação da digestibilidade real ou verdadeira, que foi expressa em porcentagem, como recomenda a NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE (1963).

A digestibilidade verdadeira é definida pela seguinte equação:

$$D_v = \frac{I - (F - FK)}{I} \times 100$$

em que

D_v = Digestibilidade verdadeira;

I = Nitrogênio ingerido;

F = Nitrogênio fecal do grupo experimental;

FK = Nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção das plasteínas

O sobrenadante de plasteína obtido possui coloração marrom, enquanto o precipitado de plasteína apresenta coloração creme.

O rendimento da reação da plasteína foi de 43%, tomando-se como base a utilização de 100 gramas da matéria-prima e formação de 43 gramas da plasteína. Este resultado foi inferior ao obtido por MIRANDA et al. (1991), que foi de 60%, utilizando a proteína de soja e a caseína como substratos e a pancreatina para hidrólise e síntese. Porém, os autores citados utilizaram matéria-prima com teor protéico mais elevado.

4.2. Teor protéico

Para avaliar a qualidade de um alimento, deve-se levar em consideração a concentração, o balanço metabólico e a biodisponibilidade dos nutrientes, além da presença de substâncias tóxicas e fatores antinutricionais.

As análises dos produtos utilizados mostram valores aceitáveis em todos os aspectos apresentados, sendo no caso o maior interesse voltado para o teor protéico e valor biológico das proteínas utilizadas.

Os teores de proteínas do isolado protéico de folha de mandioca, isolado protéico de soja e do concentrado protéico de soro ultrafiltrado, plasteína precipitada e sobrenadante de plasteína, estão no Quadro 4.

Quadro 4 - Teor protéico das amostras

	IPFM ¹	IPS ²	CPSU ³	P ⁴	SP ⁵
Teor protéico (%)	54,70	83,16	64,70	52,61	72,00

¹ Isolado protéico de folha de mandioca

² Isolado protéico de soja

³ Concentrado protéico de soro ultrafiltrado

⁴ Plasteína precipitada

⁵ Sobrenadante de plasteína

O teor do isolado protéico de folha de mandioca é semelhante àqueles obtidos por CHAVES (1987), que comparou a composição protéica de acordo com a data da colheita, observando maior teor protéico no suco e concentrado da planta mais nova, e por PELÚZIO (1993), que trabalhou com isolado protéico da folha de mandioca para obtenção da plasteína, associado com caseína, utilizando pancreatina para hidrólise e síntese, obtendo 51,97%. O teor do isolado protéico de soja e do concentrado protéico de soro ultrafiltrado mostra resultados que condizem com os obtidos por FORATO (1994), que trabalhou com o isolado protéico de soja e concentrado protéico de soro ultrafiltrado como substratos para a reação de plasteína, utilizando a pancreatina para hidrólise e síntese enzimática, obtendo 80,27 e 65,26%, respectivamente. O teor do concentrado protéico de soro ultrafiltrado poderá ser aumentado, submetendo-se o soro ao desnate antes do processo de ultrafiltração.

Quanto às plasteínas obtidas, o sobrenadante de plasteína apresentou teor protéico mais elevado que a plasteína precipitada. Isto ocorreu em virtude de a maior concentração da proteína do isolado protéico de folha de mandioca na plasteína precipitada e por ela ser de mais difícil ressolubilização, interferindo na formação da plasteína. Restou assim maior concentração de pequenos peptídios em solução, estando combinados com substâncias não-protéicas. Portanto, um teor protéico foi mais elevado no sobrenadante de plasteína. Segundo PELÚZIO (1993) e FORATO (1994), os sobrenadantes de plasteína apresentaram maior teor protéico que a plasteína precipitada, sendo os valores do sobrenadante de plasteína 64,39 e 63,33% e da plasteína precipitada 61,36 e 60,37%, respectivamente.

Os valores obtidos não coincidem com os de MIRANDA et al. (1991), que, para obtenção da plasteína, trabalharam com isolado protéico de soja e caseína e pancreatina como enzima hidrolítica e de ressíntese, obtendo maior teor de proteína na plasteína precipitada (71,17%) em relação ao sobrenadante de plasteína (63,70%). Entretanto, os substratos utilizados eram de origem industrial e, portanto, com alto valor protéico, e muito baixo teor de substâncias não-protéicas, que poderiam interferir no processo de síntese.

O uso de isolados protéicos não-purificados, como o isolado protéico da folha de mandioca, pode apresentar constituintes que, acompanhando os aminoácidos, com eles se combinam e formam substâncias pouco solúveis e que, portanto, irão acompanhar a plasteína precipitada, diminuindo assim a porcentagem de proteína. Por este motivo, recomenda-se a utilização de isolados protéicos purificados para a realização da reação da plasteína.

4.3. Atividade de urease

A medida da atividade de urease é um indicador da atividade de fatores antinutricionais que afetam a digestibilidade das proteínas no trato gastrointestinal, tais como os inibidores de tripsina e a hemaglutinina.

O valor nutritivo da proteína da soja aumenta quando fatores antinutricionais, como, por exemplo, o inibidor de tripsina é inativado. A inativação da lipoxigenase melhora sobremaneira a palatabilidade e estabilidade do produto durante o período de estocagem (BAKER e MUSTAKAS, 1973). O inibidor de tripsina é um dos mais conhecidos inibidores e o mais exaustivamente estudado entre os fatores antinutricionais da soja. É chamado de “inibidor de tripsina” devido a sua capacidade de interferir com a atividade digestiva da tripsina no intestino dos animais, incluindo o homem (PELÚZIO, 1993). A resistência térmica dos fatores antitriptico, da hemaglutinina e da urease é semelhante.

Quando medida a atividade de urease, foram obtidos valores inferiores aos permitidos, o que indica melhor digestibilidade do produto. A plasteína precipitada apresentou diferença de pH em relação ao branco de 0,02, enquanto no sobrenadante de plasteína essa diferença foi de 0,04, sendo 0,2 o máximo permitido. Os baixos valores dos fatores antinutricionais ocorreram em razão do tratamento térmico durante a obtenção do isolado protéico de folha de mandioca que passa por processo de secagem em estufa a 70⁰C por 48 horas ou durante o processo de hidrólise enzimática onde existe aquecimento a 75⁰C por 10 minutos, como preconiza PUSKI (1975) ou, ainda, pela sua diluição durante a síntese de plasteína. Os inibidores podem também ter sido parcialmente hidrolisados e, conseqüentemente, inativados.

PELÚZIO (1993), trabalhando com isolado protéico de folha de mandioca e caseína, obteve redução da atividade do inibidor de tripsina após a reação de plasteína, com valores abaixo da concentração máxima permitida. Valores semelhantes foram também obtidos por MIRANDA et al. (1991), que

trabalharam com isolado protéico de soja e caseína como substratos para a reação de plasteína e pancreatina para hidrólise e síntese.

4.4. Teor de minerais

Os minerais são elementos inorgânicos necessários ao organismo, para atuar, dentre outras coisas, como catalisadores nas reações bioquímicas. A simples presença dos minerais em alimentos não implica seu total aproveitamento pelo organismo, pois existem fatores que limitam esse aproveitamento, como os inerentes ao organismo (patologias intestinais) e alimentares (composição química dos alimentos e interação entre certos minerais). Por este motivo, foram também analisados nos produtos obtidos e relacionados quanto ao teor total e nos teores vinculados às necessidades de proteína recomendadas pelo NRC (1989), conforme se observa no Quadro 5 a seguir.

Quadro 5 - Teor total de minerais das amostras antes e após a diálise

%	Plasteína precipitada		Sobrenadante de plasteína	
	antes	após	antes	após
Cálcio	0,2418	0,0330	0,0625	0,1827
Cobre	0,0009	0,0023	0,0008	0,0027
Ferro	0,0059	0,0244	0,0024	0,0031
Magnésio	0,0385	0,1244	0,0332	0,0499
Manganês	0,0010	0,0065	0,0002	0,0012
Potássio	0,2900	0,2008	0,3747	0,1113
Sódio	18,1535	2,1323	10,1635	2,6346
Zinco	0,0021	0,0097	0,0005	0,0017

As quantidades de plasteínas para suprir as recomendações diárias de proteína, segundo o NRC (1989), são as seguintes:

Quadro 6 - Quantidade de plasteína precipitada e sobrenadante de plasteína necessária para suprir as recomendações de proteínas, segundo NRC (1989)

Idade (anos)	Plasteína precipitada	Sobrenadante de plasteína
1 a 3	30	22
4 a 6	46	33
7 a 10	53	39
25 a 50 (mulher adulta)	95	69
25 a 50 (homem adulto)	120	87,5

Os teores de minerais contidos nessas quantidades de plasteínas são apresentados nos Quadros 7 e 8.

Quadro 7 - Teores de minerais contidos na plasteína precipitada (após a diálise) de acordo com a dose recomendada para ingestão diária de proteína, segundo NRC (1989)

Faixa etária (anos)	Plasteína (g)	Ca (mg)	Cu (mg)	Fe (mg)	Mg (mg)	Mn (mg)	K (mg)	Na (mg)	Zn (mg)
1-3	30,00	33,00	0,69	7,32	37,32	1,95	60,24	639,69	2,91
4-6	46,00	15,18	1,06	11,22	57,22	2,99	92,37	980,86	4,46
7-10	53,00	17,49	1,22	12,93	65,93	3,44	106,42	1130,12	5,14
25-50 mulher	95,00	31,35	2,18	23,18	118,18	6,17	190,76	2025,68	9,21
25-50 homem	120,00	39,6	2,76	29,28	149,28	7,80	240,96	2558,76	11,64

Quadro 8 - Teores de minerais contidos no sobrenadante (após a diálise) de plasteína de acordo com a dose recomendada para ingestão diária de proteína, segundo NRC (1989)

Faixa etária (anos)	Plasteína (g)	Ca (mg)	Cu (mg)	Fe (mg)	Mg (mg)	Mn (mg)	K (mg)	Na (mg)	Zn (mg)
1-3	22,00	39,60	0,59	0,68	10,98	0,26	24,49	579,61	0,37
4-6	33,00	59,4	0,89	1,02	16,5	0,40	36,7	869,4	0,56
7-10	39,00	70,2	1,05	1,2	19,5	0,47	43,4	1027,5	0,66
25-50 mulher	69,00	124,2	1,86	2,1	34,4	0,83	76,8	1817,9	1,17
25-50 homem	87,50	157,5	2,36	2,7	43,7	1,05	97,4	2305,3	1,49

Quadro 9 - Percentagem de adequação de minerais contidos na plasteína precipitada, segundo NRC (1989)

faixa etária (anos)	Ca	Cu	Fe	Mg (%)	Mn	K	Na	Zn
1-3	4	98	73	47	130	3,65-10,95	65,60-196,82	29
4-6	2	100	112	48	150	3,98-11,92	72,35-217,97	45
7-10	2	100	129	39	115	3,55-10,64	62,78-188,35	51
25-50 (mulher)	4	100	154	42	123	3,38-10,17	61,38-184,15	97
25-50 (homem)	5	100	293	43	156	4,26-12,85	77,54-232,61	78

Quadro 10 - Percentagem de adequação de minerais contidos no sobrenadante de plasteína, segundo NRC (1989)

Faixa etária (anos)	Ca	Cu	Fe	Mg (%)	Mn	K	Na	Zn
1-3	5	84	7	14	26	1,48-4,45	59,45-178,34	4
4-6	7	89	10	14	27	1,58-4,74	64,40-193,20	6
7-10	9	100	12	12	23	1,45-4,34	57,08-171,25	7
25-50 (mulher)	15	100	14	12	41	1,36-4,10	55,09-165,26	10
25-50 (homem)	20	100	27	12	52	1,72-5,19	69,86-209,57	10

A plasteína precipitada e o sobrenadante de plasteína forneceram entre 4% e 20% da recomendação (NRC, 1989) de cálcio, não sendo, portanto, boas fontes deste mineral. O cobre fornecido pela plasteína precipitada e pelo sobrenadante de plasteína supre de 80 a 100% das recomendações, segundo NRC, e de acordo com a faixa etária. Este fornecimento é importante porque o cobre participa da formação e da atividade de algumas enzimas e sua função mais importante é como co-fator na síntese dos fosfolípidos.

A plasteína precipitada é boa fonte de ferro, chegando a ultrapassar as recomendações do NRC (1989), com exceção da recomendação para crianças na faixa etária de 1 a 3 anos. O ferro tem papel essencial na formação da hemoglobina, ele intervém no transporte de oxigênio para os tecidos e nos processos de oxirredução intracelular, formando parte do citocromo. Contudo a ingestão excessiva de ferro resulta em hemossiderose, condição na qual o ferro é depositado no fígado e em outros tecidos do organismo. O sobrenadante de plasteína não é boa fonte de ferro, por estarem apenas entre 7 e 27 % do recomendado (NRC, 1989).

O magnésio é suprido em quase 50% do recomendado pelo NRC (1989) pela plasteína precipitada, tendo este mineral importante papel na ativação dos sistemas enzimáticos relacionados com o funcionamento das vitaminas do complexo B; na utilização do potássio, do cálcio e da proteína e na manutenção da atividade elétrica nos nervos e nos músculos. O sobrenadante de plasteína não é boa fonte de magnésio, por estarem apenas entre 12 e 14 % do recomendado (NRC, 1989).

A plasteína precipitada supriu o recomendado de manganês, ultrapassando o recomendado (NRC, 1989) e no sobrenadante de plasteína o manganês fornecido chega a suprir 41 e 52% para mulher adulta e homem adulto, respectivamente. O manganês encontra-se relacionado à formação dos ossos, à reprodução e à função do sistema nervoso central. É um componente dos sistemas enzimáticos. Em humanos, a toxicidade pode ser observada somente em operários expostos a altas concentrações de manganês no ar, mas não como consequência de ingestão dietética por pessoas consumindo entre 8 e 9 mg por dia (NRC, 1989) no alimento. A plasteína precipitada encontra-se em níveis não tóxicos.

A plasteína precipitada e o sobrenadante de plasteína não são boas fontes de potássio, por estarem entre 1,36 e 12,85 % do recomendado (NRC, 1989).

A diálise fez-se necessária devido às altas concentrações de sódio na plasteína precipitada e no sobrenadante de plasteína, após a diálise o teor diminuiu, mas continuou excedendo o recomendado pelo NRC (2,4g de sódio ou 6g de NaCl) O sódio faz parte do mecanismo de regulação osmótica, do equilíbrio ácido-básico, da manutenção do volume sangüíneo e participação nas reações químicas intracelulares. O excesso de sódio pode ocasionar edema e hipertensão por causa do aumento de água no espaço extracelular.

O teor de zinco da plasteína precipitada chegou a suprir quase 100% para mulher adulta e dá boa contribuição para suprir as necessidades de homem adulto (78%), criança de 4 a 6 (48%) e de 7 a 10 anos (51%). O zinco é indispensável ao crescimento e é componente da insulina. O sobrenadante de plasteína não é boa fonte de zinco, por estar apenas entre 4 e 10% do recomendado (NRC, 1989).

Embora não seja conhecida sua biodisponibilidade, as plasteínas podem ser consideradas boas fontes de minerais, principalmente a plasteína precipitada.

4.5. Análise de aminoácidos

A determinação da composição aminoacídica para a avaliação do valor protéico de alimentos e dietas tem sido largamente utilizada. Este procedimento foi adotado pela FAO, em 1958, e, posteriormente, com algumas modificações, em 1966, pela FAO/OMS. O conteúdo de aminoácidos essenciais da alimentação deve ser avaliado de acordo com o padrão sugerido pela FAO/OMS/UNU, 1985, que foi baseado nas necessidades de aminoácidos essenciais para crianças pré-escolares, devendo ser utilizado para avaliar, também, os outros grupos, excetuando-se crianças de menos de um ano de idade (VANNUCCHI et al., 1990).

Os valores médios da composição aminoacídica do isolado protéico de folha de mandioca (IPFM), do isolado protéico de soja (Proteimax-90 HG), do concentrado protéico de soro ultrafiltrado (CPSU), da plasteína precipitada (PP) e do sobrenadante de plasteína (SP) estão dispostos no Quadro 11.

Quadro 11 - Composição aminoacídica (mg/100g do produto) do isolado protéico de folha de mandioca (IPFM), do isolado protéico de soja (Proteimax-90 HG), do concentrado protéico de soro ultrafiltrado (CPSU), da plasteína precipitada (PP) e do sobrenadante de plasteína (SP)

Aminoácidos	IPFM ¹	Proteimax-90 HG ²	CPSU ²	PP	SP
Triptofano	ND	ND	ND	ND	ND
Lisina	3,10	6,50	8,80	2,65	7,13
Histidina	1,14	2,74	2,02	1,06	1,76
Arginina	3,57	8,97	3,06	2,86	3,56
Ácido aspártico	5,10	12,93	11,60	6,27	13,65
Treonina	2,51	4,10	8,04	2,27	5,66
Serina	2,54	6,03	6,51	2,22	4,35
Ácido glutâmico	5,62	21,59	18,34	10,65	33,93
Prolina	3,14	5,08	6,62	3,06	10,54
Glicina	2,83	4,42	2,15	2,06	5,02
Alanina	3,15	4,40	5,93	2,27	6,10
Cistina	ND	0,98	2,42	1,22	2,54
Valina	3,96	4,77	6,44	2,91	6,26
Metionina	1,35	0,74	1,30	0,71	1,86
Isoleucina	2,42	4,72	6,10	2,61	6,81
Leucina	5,02	8,71	12,06	4,47	9,53
Tirosina	2,44	4,07	3,69	11,41	1,23
Fenilalanina	3,10	5,90	3,46	3,56	3,98

1- Valores obtidos por PELÚZIO, 1993

2- Valores obtidos por FORATO, 1994

ND- não-determinado

O sobrenadante de plasteína (SP) apresentou melhor composição aminoacídica que a plasteína precipitada (PP), com exceção da tirosina que se apresentou superior na plasteína precipitada.

Com a reação de plasteína, houve melhoria na composição aminoacídica do sobrenadante de plasteína (SP) em relação aos substratos (IPFM, Proteimax-90 HG), inclusive para os aminoácidos sulfurados. Quanto à plasteína precipitada, mostrou-se superior nos teores do ácido aspártico, fenilalanina, ácido glutâmico e isoleucina em relação ao IPFM; alanina em relação ao Proteimax-90 HG; fenilalanina em relação ao CPSU. Quanto à tirosina, houve melhoria em relação a todos os substratos. O concentrado protéico de soro ultrafiltrado (CPSU) apresentou melhor perfil aminoacídico.

No Quadro 12, foi comparado o perfil aminoacídico do isolado protéico de folha de mandioca (IPFM), do isolado protéico de soja (Proteimax-90 HG), do concentrado protéico de soro ultrafiltrado (CPSU) e das plasteínas, com os requerimentos da FAO, 1973, em composição aminoacídica para lactente, pré-escolar, escolar e adulto.

Quadro 12 - Comparação dos requerimentos de aminoácidos segundo a faixa etária com a composição de aminoácidos do isolado protéico de folha de mandioca (IPFM), do isolado protéico de soja (Proteimax-90 HG), do concentrado protéico de soro ultrafiltrado (CPSU), da plasteína precipitada (PP) e do sobrenadante de plasteína (SP)

Aminoácidos	Requerimento de aminoácidos ¹ (mg/g de proteína)				Composição observada (mg/g de proteína)				
	Lactente	Pré-escolar	Escolar	Adulto	IPFM	Proteimax-90 HG	CPSU	PP	SP
His	26	19	19	16	22	34	31	20	24
Ileu	46	28	28	13	47	59	93	50	95
Leu	93	66	44	19	97	108	185	181	132
Lis	66	58	44	16	60	81	135	50	99
Met + Cis	42	25	22	17	26	21	57	37	61
Fen + Tir	72	63	22	19	60	124	109	284	72
Tre	43	34	28	9	48	51	123	43	79
Trp	17	11	9	5	ND	ND	ND	ND	ND
Val	55	35	25	13	76	59	99	55	87

1. FAO/OMS/UNU

ND - não-determinado

As necessidades de aminoácidos para as diversas faixas etárias analisadas são supridas por quase todos os produtos protéicos estudados. O IPFM não supre as necessidades de histidina, lisina, metionina + cistina para lactentes, e fenilalanina + tirosina para lactentes e pré-escolares. O Proteimax-90 HG não supre as necessidades de metionina + cistina para lactentes e pré-escolares; o CPSU supre as necessidades de todos os aminoácidos nas faixas etárias analisadas. A plasteína precipitada não supre as necessidades de histidina e metionina + cistina para lactentes, e leucina para lactentes e pré-escolares, o sobrenadante de plasteína somente não supre as necessidades de histidina para lactentes.

Pode-se verificar que tanto as matérias-primas quanto os produtos obtidos podem ser considerados boas fontes de aminoácidos essenciais especialmente para adultos e para as crianças após o desmame.

O Quadro 13 apresenta uma comparação entre o padrão sugerido para necessidades de aminoácidos essenciais, segundo FAO, 1985, e a composição aminoacídica do IPFM, do Proteimax-90 HG, do CPSU, da plasteína precipitada e do sobrenadante de plasteína.

Quadro 13 - Escore de aminoácidos¹ do isolado protéico de folha de mandioca (IPFM), do isolado protéico de soja (Proteimax-90 HG), do concentrado protéico de soro ultrafiltrado (CPSU), da plasteína precipitada (PP) e do sobrenadante de plasteína (SP)

Aminoácidos	Padrão ²	IPFM	Proteimax-90 HG	CPSU	PP	SP
Histidina	19	1,16	1,79	1,63	1,05	1,26
Isoleucina	28	1,68	2,11	3,32	1,79	3,39
Leucina	66	1,47	1,64	2,80	2,74	2,00
Lisina	58	1,03	1,40	2,33	0,86*	1,71
Metionina	25	1,04	0,84*	2,28	1,48	2,44
+Cistina						
Fenilalanina	63	0,95*	1,97	1,73	4,51	1,14
+Tirosina						
Treonina	34	1,41	1,50	3,62	1,26	2,32
Triptofano	11	ND	ND	ND	ND	ND
Valina	35	2,17	1,69	2,83	1,57	2,49

ND - não-determinado

¹ Escore de aminoácidos = $\frac{\text{mg de aminoácidos em 1g de proteína experimental}}{\text{mg de aminoácidos no padrão}}$

² Requerimento de aminoácidos para pré-escolares, segundo FAO/OMS/UNU, 1985

* Aminoácidos limitantes

Pelo escore químico foram encontrados os aminoácidos limitantes das plasteínas e das matérias-primas estudadas. O IPFM tem como limitantes fenilalanina + tirosina; o Proteimax-90 HG é limitante em metionina + cistina. Na plasteína precipitada foi encontrada como limitante a lisina. O CPSU e SP não apresentam limitações nos aminoácidos essenciais para pré-escolares. Em relação ao triptofano, por ser destruído pela hidrólise ácida, não foi possível a sua determinação e, por conseguinte, a sua avaliação quanto à proteína padrão.

Pode-se concluir que houve incorporação de aminoácidos constituintes dos substratos nas plasteínas e melhoria da composição aminoacídica, especialmente no teor de aminoácidos sulfurados, quando comparados à soja.

4.6. Avaliação biológica

Foram avaliados o Quociente de Eficiência Líquida da Proteína (NPR), a Utilização Líquida da Proteína (NPU) e a Digestibilidade verdadeira (Dv) nos produtos obtidos, utilizando-se a caseína como padrão. Os valores médios são apresentados no Quadro 14.

Quadro 14 - Valores médios referentes ao NPR, ao NPU e à Digestibilidade das dietas experimentais e da caseína

Fonte protéica da dieta	NPR	NPU	Digestibilidade (%)
Caseína	4.03 a	63.14 a	89.64 a
Sobrenadante de plasteína	3.80 a	53.80 b	81.75 b
Plasteína precipitada	3.75 a	57.51 ab	62.99 c

Dentro de uma mesma coluna, as médias seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 15 - Porcentagem de adequação dos valores médios de NPR, NPU e digestibilidade das dietas experimentais em relação à caseína

Fonte protéica da dieta	Adequação (%)		
	NPR		NPU
	Digestibilidade		
Sobrenadante de plasteína	94,3	85,21	91,20
Plasteína precipitada	93,05	91,08	70,27

A plasteína precipitada e o seu sobrenadante apresentaram Quocientes de Eficiência Líquida Protéica (NPR) estatisticamente semelhantes ao da caseína (Quadro 14). Resultado semelhante ao obtido por FORATO (1994), quando trabalhou com concentrado protéico de soro ultrafiltrado (CPSU) e isolado protéico de soja como substratos para síntese de plasteína. O mesmo autor obteve valor de NPR do CPSU superior à caseína, o isolado protéico de soja apresentou NPR inferior à caseína. PELÚZIO (1993), trabalhando com isolado protéico de folha de mandioca e caseína como substratos para síntese de plasteína, encontrou valores de NPR do isolado protéico de folha de mandioca, da plasteína precipitada e do sobrenadante de plasteína inferiores ao da caseína, mas o NPR do isolado protéico de folha de mandioca foi inferior ao NPR das plasteínas, concluindo que a reação de plasteína foi eficiente na melhoria do aproveitamento da proteína.

O NPU da plasteína precipitada não diferiu estatisticamente da caseína (Quadro 11) e, quanto ao NPU do sobrenadante de plasteína, foi inferior à caseína, correspondendo a 85,21% desse padrão (Quadro 15). Não foram observadas diferenças significativas entre os valores de NPU da plasteína precipitada e do sobrenadante de plasteína. Tais resultados não são condizentes

com os obtidos por FORATO (1994), cujos valores de NPU da plasteína precipitada e do sobrenadante de plasteína não diferiram estatisticamente da caseína, enquanto o NPU do isolado protéico de soja foi inferior à caseína e do CPSU superior a esse padrão. PELÚZIO (1993) também obteve valores de NPU do isolado protéico de folha de mandioca, da plasteína precipitada e do sobrenadante de plasteína inferiores à caseína, mas os valores das plasteínas foram superiores ao do isolado usado como substrato para a síntese.

A Figura 2 mostra os resultados referentes ao peso dos animais. Os animais que receberam dietas com plasteína apresentaram tendência semelhante à caseína, com elevado ganho de peso.

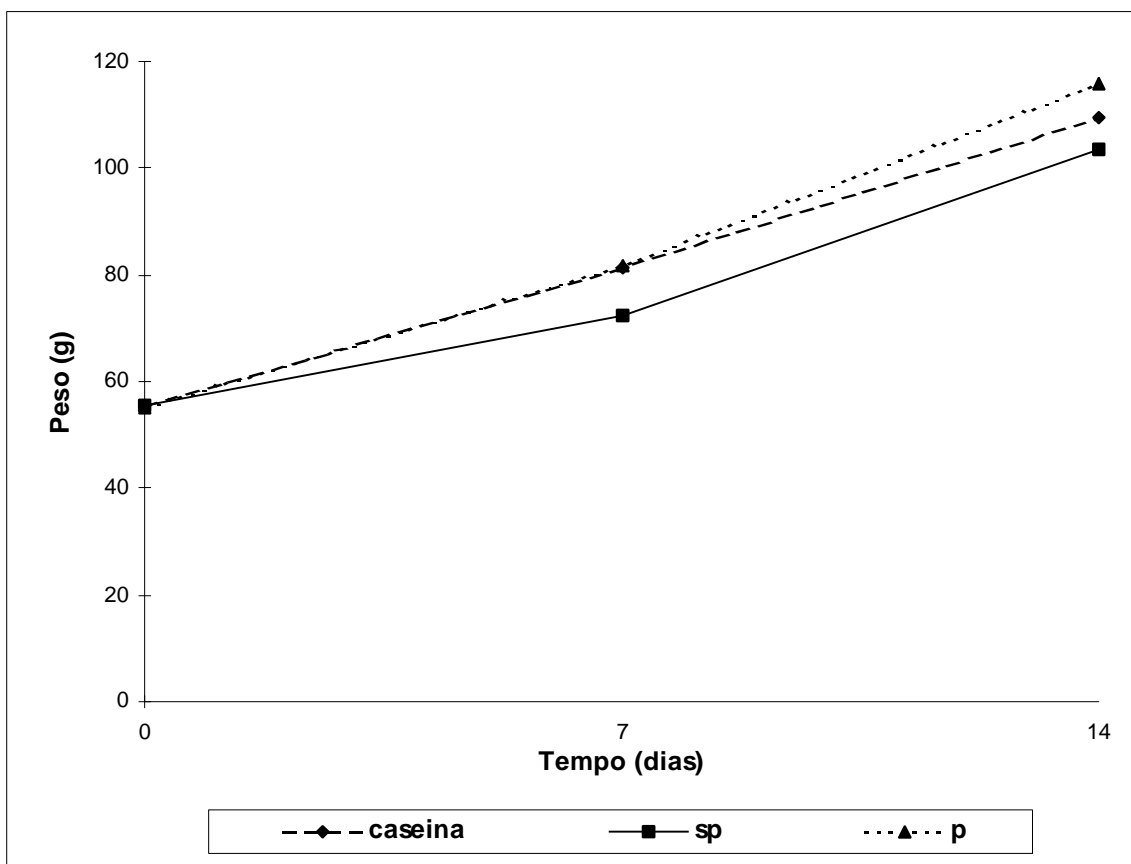


Figura 2 - Curva de crescimento de ratos submetidos a diferentes dietas experimentais (caseína, P - plasteína precipitada, SP - sobrenadante de plasteína).

A digestibilidade da plasteína precipitada, do sobrenadante de plasteína e da caseína diferiu estatisticamente entre si, sendo a digestibilidade da plasteína precipitada (70,27% do padrão) inferior ao sobrenadante de plasteína (91,20% do padrão). O mesmo ocorreu com os valores de digestibilidade obtidos por FORATO (1994), que também comparou a digestibilidade do concentrado protéico de soro ultrafiltrado que não diferiu estatisticamente da caseína e o isolado protéico de soja que mostrou digestibilidade inferior à caseína. Com base nos resultados obtidos por PELÚZIO (1993) verifica-se que as plasteínas não diferiram estatisticamente da caseína e que o isolado protéico de folha de mandioca foi inferior. É necessário considerar que os métodos de avaliação biológica que utilizam ratos tendem a subestimar a qualidade de algumas proteínas em relação ao ser humano (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, 1985).

Conforme se observa, espera-se que a reação de plasteína seja eficaz na melhoria da qualidade e utilização orgânica do produto obtido. As proteínas do soro de leite são de excelente qualidade nutricional e o isolado protéico de folha de mandioca é uma fonte protéica de baixa digestibilidade, o que leva ao baixo consumo da dieta e perda de peso dos animais. O sabor amargo, característico da folha de mandioca, leva também a um baixo consumo de dieta. A reação de plasteína parece melhorar as características sensoriais do isolado protéico de folha de mandioca, crescendo assim sua aceitação pelos animais.

Os aminoácidos estão mais disponíveis nas proteínas de origem animal (SGARBIERI, 1987). As proteínas de origem vegetal são geralmente inferiores nutricionalmente, dependendo dos fatores presentes nos alimentos bem como das suas condições de processamento e armazenamento, que podem modificar positiva ou negativamente a digestibilidade das proteínas (TAGLE, 1981). Neste caso, o processamento parece ter melhorado as propriedades nutricionais, tendo o produto obtido mostrado resultados altamente satisfatórios.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo do estudo foi obter um produto de valor biológico satisfatório, utilizando a proteína da folha de mandioca, do soro de queijo e da soja como substratos para a reação de plasteína.

Após a obtenção do isolado protéico da folha de mandioca e do concentrado protéico de soro ultrafiltrado, estes e o isolado protéico de soja (Proteimax-90 HG) foram hidrolisados separadamente e misturados para que ocorresse a síntese da plasteína. A enzima utilizada para a hidrólise e ressíntese foi a pancreatina. Durante o processo foram avaliados os teores protéicos das matérias-primas, e nas plasteínas obtidas foram realizadas análises para determinação dos teores de proteína, da atividade de urease, de minerais e teores de aminoácidos.

As plasteínas foram submetidas à avaliação da qualidade protéica por meio de ensaio biológico. Foram utilizados os seguintes métodos: Quociente de Eficiência Líquida Protéica (NPR), Utilização Líquida da Proteína (NPU) e Digestibilidade verdadeira (Dv).

O sobrenadante de plasteína apresentou teor de proteína superior ao do isolado protéico de folha de mandioca e do concentrado protéico de soro ultrafiltrado.

As plasteínas apresentaram índices de atividade de urease apropriados para o consumo humano.

A plasteína precipitada e o sobrenadante de plasteína são boas fontes de cobre e sódio. O ferro, manganês, magnésio e o zinco são bem fornecidos pela plasteína precipitada. A plasteína precipitada e o sobrenadante de plasteína não são boas fontes de cálcio e potássio, segundo recomendação do NRC (1989).

O sobrenadante de plasteína apresentou melhor composição aminoacídica que a plasteína precipitada, com exceção da tirosina que se apresentou superior na plasteína precipitada. Com a reação de plasteína, houve melhoria na composição aminoacídica do sobrenadante de plasteína em relação aos substratos. Quanto à plasteína precipitada, mostrou-se superior nos teores do ácido aspártico, fenilalanina, ácido glutâmico e isoleucina em relação ao IPFM; alanina em relação ao Proteimax-90 HG; fenilalanina em relação ao CPSU. Quanto à tirosina, houve melhoria em relação a todos os substratos. O concentrado protéico de soro ultrafiltrado apresentou melhor perfil aminoacídico.

Os valores do NPR da plasteína precipitada e do sobrenadante de plasteína não diferiram significativamente do padrão da caseína. Os resultados do NPU da plasteína precipitada foi estatisticamente semelhante ao padrão, porém do sobrenadante de plasteína foi inferior.

Quanto à digestibilidade, as plasteínas diferiram significativamente ($P < 0,05$) da caseína e entre si, sendo a digestibilidade da plasteína precipitada a de menor valor.

A reação de plasteína foi eficiente na melhoria do valor nutricional das fontes protéicas alternativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIAN, J. Valeur alimentaire du lait. Paris, 1973. 229 p.
- ARAI, S., YAMASHITA, M., FUJIMAKI, M. Enzymatic modification for improving nutritional qualities and acceptability of proteins extracted from photosynthetic microorganisms *Spirulina Maxima* and *Rhodopseudomonas Capsulatos* J. Nutr. Sci. Vitaminol., v.22, n. 6, p.447-456, 1976.
- ARAI, S., YAMASHITA, M., FUJIMAKI, M. Plastein reaction and its applications. Cer. F. W., v. 20, n. 2,p. 107-111, 1975.
- ARAÚJO, M. F. Caracterização funcional de isolados de um concentrado protéico de soja produzidos no Brasil. Viçosa, MG: UFV, 60p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1984.
- ASO, K., YAMASHITA, M., ARAI, S., et al. Tryptophan, threonine and lysine-enriched plasteins from zein. Agric. Biol. Chem., v. 38, n. 3, p. 679-680, 1974.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. Washington, D.C., 1984. 1141p.
- BAKER, E. C., MUSTAKAS, G. C. Heat inactivation of trypsin inhibitor, lipoxygenase and urease in soybeans: effect of acid and base additives. J. Amer. Oil Chem. Soc , v. 50, n. 5, p.137-141, 1973.
- BALDINI, V. L. S., CAMPOS, S. D. S., SREBERNICH, S. M. Sabor dos alimentos: os problemas e sua modificação. Bol. ITAL, v. 20, n 4, p. 249-260, 1983.

- BEATON, N. C. Ultrafiltration and reverse osmosis in the dairy industry - An introduction to sanitary considerations. J. Food. Protect. , v. 42, n. 7, p. 584-590, 1979.
- BELIKOV, V. M., GOLOLOBOV, M. YU. Plasteins Their preparation, properties and use in nutrition. Die Nahr., v. 30, n. 3, 4, p. 280-287, 1986.
- BENDER, A.E., DOELL , B.H. Biological evaluation of proteins: a new aspect. Brit. J. Nutr., v. 11, n. 5, p. 140-143 , 1957.
- BIRMAND, D., CRUZ, R., STRINGUETA, P. R., et al. Mistura pré-gelatinizada de quirera de arroz, batata inglesa e soro de queijo em pó. Bol. SBCTA, v. 18, n. 2, p. 128-140, 1984.
- BOBBIO, P. A., BOBBIO, F. O. Química do processamento de alimentos. 2. ed. São Paulo: Varela, 1992. 151p.
- BODINSKI, L. H. Dietoterapia- princípios e prática. São Paulo: Atheneu, 1993. 410p.
- CARVALHO, V. D., KATO, M. S. A. Potencial de utilização da parte aérea da mandioca. Inf. Agropec. , v. 13, n. 145, p. 23-27, 1987.
- CHAVES, J. G. Extrato protéico das folhas de mandioca. Inf. Agropec., v.13, n. 145, p. 47-52, 1987.
- CONDACK, J. Ultrafiltração do soro: parâmetros operacionais e utilização do concentrado protéico na fabricação de requeijão cremoso. Viçosa, MG: UFV, 117p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1992.
- EDWARDS, J. H., SHIPE, W. F. Characterization of plastein reaction products formed by pepsin, alfa chymotrypsin treatment of egg albumin hydrolisates. J. Food Sci. v. 43, n. 4, p. 1215-1218. 1978.
- ERIKSEN, S., FAGERSON, I. S. The plastein reaction and its applications : a review. J. Food Sci. . v.41, n. 3, p. 490-493, 1976.
- FAO. Necessidades de energia y de proteínas: informe de un comité especial mixto FAO/OMS de expertos. Roma, 1973. 138p. (Série de Informes Técnicos, 522).
- FORATO, A. L. S. C. Caracterização nutricional da plasteína obtida da proteína da soja e das proteínas de soro de queijo. Viçosa, MG: UFV, 52p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 1994.

- FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. 8 ed. Atheneu, 1987. 230p.
- FUJIMAKI, M., ARAI, S., YAMASHITA, M. Enzymatic protein degradation and resynthesis for protein improvement. In: FEENEY, R. E., WAI TAKER, J. R. Food protein Westport : Avi, 1977. p. 156-184.
- FUJIMAKI, M., YAMASHITA, M., ARAI, S. et al. Enzymatic modification of proteins in food stuffs. I. Enzymatic proteolysis and peptide synthesis application for preparation of protein-like substances. Agric. Biol. Chem., v. 34, n.9, p. 1325-1332, 1970.
- IDROGO, I.H.A. Farinha desengordurada de soja e carne de frango processadas por extrusão. Viçosa, MG, UFV, 57 p, Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1984.
- LEHNINGER, A.L., Princípios de Bioquímica. São Paulo, Sarvier, 1990. 725p.
- MARCHINI, J. S., FREITAS, O., OLIVEIRA, J. E. D. de. Avaliação bioquímica e nutricional de dois hidrolisados enzimáticos de proteína de soja. C. Tecn. Alim., v. 5, n. 1, p. 12-21 , 1985.
- MARCONDES, E., MONTEIRO, D. M., BARBIERI, D. et al. Desnutrição. São Paulo: Sarvier, 1976. 286 p.
- MILLER , D.S., BENDER , A.C. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. Brit. J. Nutr., v.9, n. 5, p. 382-388 , 1955.
- MIRANDA , L.C.G., MENDONÇA , R. C. S., ALBUQUERQUE, T. T. O. Síntese de plasteínas : caracterização de algumas propriedades nutricionais . R. Ceres , v. 38, n. 218, p. 277-285, 1991.
- MIRANDA, L. C. G., OLIVEIRA, T. T. , MENDONÇA, R. C. S. Comparação aminoacídica de hidrolisados de proteína de soja, de caseína e de três plasteínas obtidas desses hidrolisados. R. Ceres , v. 41, n.235, p. 288-298, 1994.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. Evaluation of protein quality. Washington, D.C., 1963. 74 p.
- NETO , M.J.A. As múltiplas alternativas de uso da mandioca . Inf Agropec, v. 13, n. 145, p. 1, 1987.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 10 ed. Washington, D.C., 1989. 287p.

- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD - OMS. Necessidades de energia y de proteínas .Ginebra, 1985. 220p.
- PALLAVICINI , C., ZAMORANI , A. Rassegna degli aspetti e applicativi della reazione plasteinica. Ind. Alim., v. 17, n. 20, p. 39-43, 1978.
- PALLAVICINI, C., FINLEY, J. W., STANLEY, W.L. et al. Plastein synthesis with: chymotrypsin immobilised on chitin. J. Sci. F. Agr., v. 31, n. 3, p. 273-278, 1980.
- PELLET, P. L., YOUNG, V.R. Nutrition evaluation of protein foods. Washington , D.C. The United Nations University, 1980. 154 p.
- PELÚZIO, M.C.G. Caracterização nutricional da plasteína obtida da proteína da folha de mandioca e da caseína .Viçosa , MG: UFV, 56p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 1993.
- PEREIRA, L., CAMPOS, S .D. S. Produtos à base de soja em programas institucionais. Bol. SBCTA, v. 15, n.2, p. 147-174, 1981.
- PUSKI, G. Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment. Cer. Chem., v. 52, n. 5, p 655. 1975.
- RAVIDRAN, G., RAVIDRAN, V. Changes in the nutritional composition of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves during maturity. F. Chem., v.27, n. 4, p. 299-309, 1988.
- REPORT OF THE AMERICAN INTITUTE OF NUTRITION. J. Nutr., Baltimore, v.107, n. 8, p. 1340-1348, 1977.
- RIBEIRO, J. L. F. Avaliação de alternativas para adição de nitrato de sódio ao leite para a fabricação de queijo. Lavras, MG: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 75p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Escola Superior de Agricultura de Lavras,1989.
- ROMERO, A. R., BARATTA, C. Composition, functional properties, and biological evaluation of a plastein cassava leaf protein. Plant foods hum nutr., v. 37, n. 1, p. 85-96, 1987.
- SGARBIERI ,V.C. Alimentação e nutrição : fator de saúde e desenvolvimento . Campinas: UNICAMP, 1987.387p.
- SOGORB , F.S., SANTANA , E.Q., DAMY , S. B.et al. Importância da proteína para o crescimento: estudo experimental em coelhos (*oryctologus cuniculus*). Salusvita, v. 9, n. 1, p. 71-80 ,1990.

- SOLÁ, J. E. Manual de Dietoterapia do Adulto .6 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1988. 550p.
- SPACKMAN, D.H., STANFORD, M. Automatic recordings apparatus for use in the chromatography of aminoacids. Anal. Chem., v.307, n. 4, p. 1190-1206, 1958.
- TAGLE, M. A. Nutrição. São Paulo: Artes Médicas, 1981. 243p.
- TORÚN, B., VITERI, F.E., YOUNG, V. R. Nutritional role of soya protein for humans. J. Amer. Oil Chem. Soc., v. 58, n. 3, p. 400-406, 1981.
- VANNUCCHI, H, MENEZES, E. W., CAMPANHA, H. O.et al. Aplicações das recomendações nutricionais adaptadas à população brasileira. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, Legis Suma, 1990. 156 p.
- VARANINI, Z.,PALAVACINI, C., FINCATI, G. et al. Miglioramento delle rose nella sintesi di plasteina com enzima immobilizzati. Ind Aliment, v.18, n. 10, p. 735-740. 1979.
- VIEIRA, S .D .A, NEVES, B. S. Elaboração de bebidas ácidas e achocolatadas a partir de soro de queijo ultrafiltrado. Alimentação, v. 107, n. 79, p. 21-26, 1985.
- YAMASHITA, M., ARAI, S., FUJIMAKI, M. A low-phenylalanine, high-tirosine plastein as an acceptable dietetic food. Method of preparation by use of enzymatic protein hidrolysis and resynthesis. J. Food Sci., v. 41, n. 5, p. 1029-1032, 1976a.
- YAMASHITA, M., ARAI, S., FUJIMAKI, M. Plastein reaction for food protein improvement. J. Agric. Food Chem., v. 24, n. 6, p. 1100-1104, 1976b.
- YAMASHITA, M., ARAI, S., GONDA, M. et al. Enzymatic modification of proteins in foodstuffs. II .Nutritive properties of soy plastein and its bio-utility evaluation in rats. Agrc.Biol. Chem., v. 34, n. 9, p. 1333-1337, 1970.
- YAMASHITA, M., ARAI, S., TSAI, S. et al. Plastein reaction as a method for enhancing the sulfur-containing aminoacid level of soybean protein. J. Agric. Food Chem., v.19, n. 6, p. 1151-1154, 1971.
- YAMASHITA, M., ARAI,S., KOKUBO, S. et al. Synthesis and characterization of glutamic acid enriched plastein with greater solubility. J. Agric. Food.Chem., v. 23, n. 1, p. 27- 30 , 1975.

APÊNDICE

APÊNDICE

Quadro 1A - Dados Obtidos das Variáveis PI (Peso Inicial), PF (Peso Final), GP (Ganho de Peso), PC (Proteína Consumida), NI (Nitrogênio Ingerido), PRS (Peso do Rato Seco), PRD (Peso do Rato Desengordurado) e NC (Nitrogênio da Carcaça) para avaliação da qualidade protéica das formulações

Dieta	Rato	PI (g)	PF (g)	GP (g)	PC (g)	NI (g)	PRS (g)	PRD (g)	NC (g)
CAS	1	52	104	52	17,26	2,77	37,8	24,1	2,55
	2	54	120	66	16,42	2,63	43,6	24,7	2,36
	3	54	106	52	16,34	2,62	32,0	23,6	2,38
	4	57	109	52	15,26	2,44	36,2	24,2	2,35
	5	58	106	48	15,45	2,47	33,9	22,6	2,82
	6	58	112	54	16,42	2,63	37,8	24,4	2,55
PP*	1	52	118	66	19,40	3,11	44,0	23,1	2,48
	2	52	120	68	20,33	3,26	40,8	24,5	2,49
	3	56	107	51	17,98	2,88	34,8	23,1	2,57
	4	56	107	51	17,11	2,74	36,5	23,7	2,37
	5	58	127	69	20,46	3,28	45,5	25,7	2,64
	6	58	117	59	20,04	3,21	38,9	24,8	2,54
SP**	1	52	94	42	13,66	2,19	28,7	21,0	2,31
	2	53	101	48	15,51	2,48	32,2	21,0	2,40
	3	55	109	54	17,11	2,74	37,9	20,7	2,20
	4	57	103	46	15,60	2,50	31,4	22,4	2,36
	5	58	109	51	16,52	2,65	35,0	23,0	2,49
	6	58	106	48	15,73	2,52	32,8	22,7	2,46

* - Plasteína Precipitada

** - Sobrenadante de Plasteína

Quadro 2A - Resumo da Análise de Variância dos Dados de NPR, NPU e Digestibilidade

Fontes de Variação	NPR		NPU		D	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Tratamento	2	0,1377166*	2	132.6531*	2	1123.685*
Resíduo	10	0,6044998 E-01	10	31,92888	10	21.15347

* - Significativo, pelo teste F, a 1% de probabilidade.