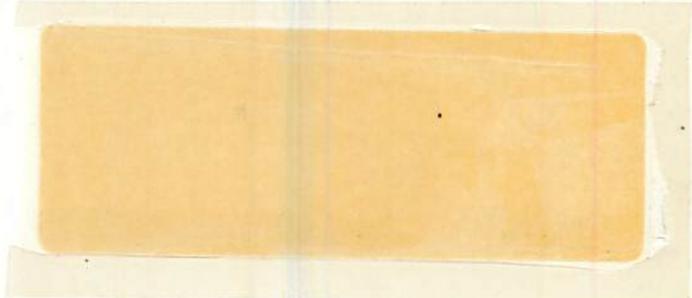


MARIA AUXILIADORA EFREM NATIVIDADE

ESTUDO QUÍMICO E NUTRICIONAL DO CONCENTRADO PROTÉICO DE
FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.) OBTIDO POR
TERMOCOAGULAÇÃO

Bat. uf.

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do grau de MESTRE.



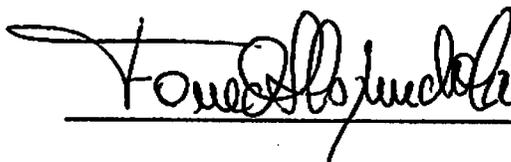
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

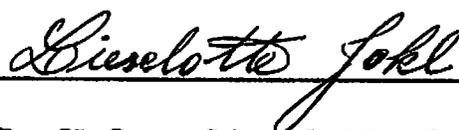
1992

ESTUDO QUÍMICO E NUTRICIONAL DO CONCENTRADO PROTÉICO DE
FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.) OBTIDO POR
TERMOCOAGULAÇÃO

APROVADA:



Prof. Dr. Foued Salmen Espindola
Orientador



Profª Dra. Lieselotte Joki



Profª Dra. Vânia Déa de Carvalho

"O desejo de se buscar constantemente o conhecimento é uma atitude que garante ao homem sua própria existência".

Aos meus pais: Dalva e João

Aos meus sobrinhos

A Dinalva, Adalvina e Rosângela
pelo incentivo.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por orientar-me proporcionando condições para o desenvolvimento moral, intelectual e espiritual no decurso de minha vida.

À Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, especialmente ao Departamento de Ciência dos Alimentos - DCA, pela oportunidade concedida para a realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Dr. Foued Salmen Espíndola da Universidade Federal de Uberlândia, pela eficiente orientação.

Ao professor Dr. Fábio Borja Portela, pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Renato Sant'Ana da Universidade Federal de Viçosa - UFV e Dr. Lewis Joel Greene da Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela realização da análise de aminoácidos.

À professora Adalvina Efrem Natividade, pela correção

da dissertação.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão - FAEPE, pela gentileza do fornecimento da matéria-prima.

Aos professores Evódio Ribeiro Vilela - DCA, Vânia Déa de Carvalho - EPAMIG, Custódio Donizete dos Santos - DQI, Amauri Alvarenga e Luiz Edson Oliveira - DBI, pela permissão do uso de laboratório.

Ao DCA/ESAL através de seus docentes, funcionários e colegas.

A todos os professores do curso, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição de Plantas - DCS, do Laboratório de Nutrição Animal - DZO, do Laboratório de Análise Foliar - DQI, do Laboratório de Biologia - DBI, do Laboratório da EPAMIG -DCA e da Biblioteca Central da ESAL, pela disponibilidade e colaboração.

Ao químico Gilberto João Padovan funcionário do Centro Interdepartamental de Química da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela contribuição na análise de aminoácidos.

À Denise G. de Santana pelo auxílio na análise estatística.

Ao Tales M. de Oliveira Giarola pelas figuras e fotografias desse trabalho.

A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

"Querer pouco: terás tudo.

"Querer nada: serás livre"

(Ricardo Reis)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À professora Angelita Duarte Corrêa - DQI/ESAL, pela amizade, apoio e sugestões apresentadas nesse trabalho.

À professora Dr^a Sin-Huei Wang, pelas sugestões e atenção para com esse trabalho.

Aos professores e amigos Drs. Isabel e Adimilson Chitarra por serem modelos de dedicação profissional e pelo amor à Ciência.

Ao bioquímico Dr. Marcos Rogério Efrem Natividade pelo auxílio nas traduções da literatura consultada.

Ao professor Dr. Luiz R. Goulart Filho, do Departamento de Agronomia da UFU pela orientação nas análises estatísticas.

A vocês, nosso muito obrigado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1. Proteínas de folhas	6
3.2. Cana-de-açúcar	8
3.3. Aspectos bioquímicos da ribulose 1-5 bifosfato carbo- xilase/oxigenase	11
3.4. Fatores que afetam a qualidade nutricional dos con- centrados protéicos de folhas	13
3.5. Concentrado protéico de folhas	18
3.5.1. Extração de proteínas foliares	18
3.5.2. Obtenção de proteínas foliares	23
3.6. Aspectos nutricionais dos concentrados protéicos fo- liares	27
3.6.1. Composição química	27
3.6.2. Concentrado protéico na alimentação animal e humana	32

4. MATERIAL E METODOS	34
4.1. Material	34
4.1.1. Matéria-prima	34
4.1.2. Estudo nutricional	35
4.1.3. Reagentes e vidraria	35
4.2. Métodos experimentais	36
4.2.1. Obtenção do concentrado protéico de folhas de cana-de-açúcar	36
4.2.2. Métodos analíticos	38
4.2.3. Parâmetros nutricionais	43
4.2.3.1. Métodos químicos	46
4.2.3.2. Testes biológicos	48
4.3. Análise estatística	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1. Obtenção do CPF e rendimento protéico	54
5.2. A folha de cana-de-açúcar e a produção de CPFs e RF .	58
5.2.1. Composição centesimal aproximada da folha e do RF	59
5.2.2. Elementos minerais	62
5.2.3. Amido, açúcares totais, redutores e não redu- tores	64
5.2.4. Carotenóides totais	65
5.2.5. Compostos fenólicos totais	66
5.2.6. Aminoácidos	68
5.3. Composição química aproximada no CPF de cana-de-açú- car	70

5.3.1.	Conteúdo de elementos minerais nos CPFs	77
5.3.2.	Teores de amido, açúcares redutores, não redu- tores e totais nos CPFs	81
5.3.3.	Carotenóides totais	82
5.3.4.	Compostos fenólicos - taninos	85
5.4.	Avaliação da qualidade protéica do CPF de cana-de-a- çúcar	88
5.4.1.	Composição de aminoácidos	88
5.4.2.	Composição das dietas	96
5.5.	Avaliação biológica do CPF	97
5.5.1.	Índices de crescimento	98
5.5.2.	Utilização protéica líquida verdadeira	104
5.5.3.	Digestibilidade "in vitro" e "in vivo" do CPF de cana-de-açúcar	107
6.	CONCLUSÕES	111
7.	RESUMO	113
8.	SUMMARY	115
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
	APÊNDICE	143

LISTA DE QUADROS

QUADROS		PÁGINA
1	Composição centesimal básica das dietas utilizadas nos ensaios biológicos	45
2	Mistura mineral adicionada às dietas usadas na alimentação dos ratos	45
3	Mistura vitamínica adicionada às dietas usadas na alimentação dos ratos	46
4	Rendimento médio de extração protéica de folhas de cana-de-açúcar colhidas nos meses de julho, outubro e dezembro/91 empregando diferentes pH's antes da termocoagulação na produção de CPFs	56
5	Teores médios de elementos minerais nas folhas e resíduo fibroso (RF) de cana-de-açúcar. Nov./91. DCA-ESAL, Lavras-MG	62

QUADROS

PÁGINA

6	Valores médios de amido, açúcares não redutores (% de sacarose), redutores (% de glicose) e totais obtidos nas folhas e RF de cana-de-açúcar. Dez./91. DCA/ESAL, Lavras-MG	65
7	Teores percentuais de compostos fenólicos das folhas e RF de cana-de-açúcar. Dez./91. DCA - ESAL, Lavras-MG	67
8	Composição em aminoácidos das folhas e RF de cana-de-açúcar em comparação com a proteína de referência da FNB (1980). Dez./91. DCA-ESAL, Lavras-MG	69
9	Composição centesimal aproximada nos CPFs de cana-de-açúcar. Nov./91. DCA-ESAL, Lavras-MG ..	72
10	Teores de elementos minerais nos CPFs de cana-de-açúcar. Out./91. DCA/ESAL, Lavras-MG	78
11	Valores médios de amido, açúcares não redutores (% em sacarose), redutores (% em glicose) e totais obtidos nos CPFs de cana-de-açúcar. Dez. 91. DCA/ESAL, Lavras-MG	82
12	Teores percentuais de taninos e compostos fenólicos totais dos CPFs de cana-de-açúcar. Nov. 91. DCA/ESAL, Lavras-MG	87
13	Composição em aminoácidos dos CPFs de cana-de-açúcar em comparação com a proteína de referência. Dez./91. DCA/ESAL, Lavras-MG	90

QUADROS

PÁGINA

14	Teores médios de aminoácidos essenciais e relação A/E obtidos nos CPFs de cana-de-açúcar. Dez./91. DCA/ESAL, Lavras-MG	94
15	Composição centesimal aproximada das dietas oferecidas aos animais no ensaio biológico. Dez. 91. DCA/ESAL, Lavras-MG	96
16	Média e desvios padrões da eficiência alimentar (CEA), coeficiente de eficácia protéica (CEP) e razão protéica líquida (RPL) dos animais alimentados com dieta à base de CPF de cana-de-açúcar e caseína "ad-libitum". Dez./91. DCA/ESAL, Lavras-MG	99
17	Valores médios e desvio padrão em função da análise das carcaças dos animais alimentados com dieta à base de CPF de cana-de-açúcar e dieta controle de caseína. Dez./91. DCA/ESAL, Lavras-MG	105
18	Média e desvio padrão da digestibilidade in vitro, digestibilidade aparente (Da) e digestibilidade verdadeira da proteína (Dv) dos animais alimentados com dietas à base de CPF de cana-de-açúcar e caseína. Dez./91. DCA/ESAL, Lavras-MG	107

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		PÁGINA
1	Corte transversal de uma folha de cana-de-açúcar apresentando a estrutura Krams ou concêntrica	9
2	Esquema de obtenção do CPF indicando os subprodutos de extração, a composição de nutrientes de cada fração e suas aplicações ..	24
3	Fluxograma para obtenção do concentrado protéico de folha de cana-de-açúcar	39
4	Composição centesimal aproximada nas folhas, resíduo fibroso (RF) e concentrado protéico de folhas (CPF2) de cana-de-açúcar. Out./91. DCA/ESAL, Lavras-MG	60
5	Composição centesimal aproximada nos concentrados protéicos de folhas (CPFs) de cana-de-açúcar. Nov./91. DCA/ESAL, Lavras-MG	71

FIGURAS**PÁGINA**

6	Comparação entre a composição centesimal aproximada em CPFs de cana-de-açúcar com dados da literatura . Nov./91. DCA/ESAL, Lavras-MG	76
7	Valores médios de carotenóides totais obtidos das folhas, RF e CPFs de cana-de-açúcar	84
8	Comparação entre o escore de aminoácidos do CPF de cana-de-açúcar e os de alimentos comuns	92
9	Crescimento médio dos ratos utilizados no ensaio biológico de CEP do CPF e do grupo controle alimentado à base de caseína. Dez./91. DCA/ESAL, Lavras-MG	102

1. INTRODUÇÃO

Por vários anos, cientistas e tecnólogos de alimentos vêm trabalhando para defender o uso da proteína foliar na nutrição humana. Hoje, os pesquisadores preocupam-se em investigar, cada vez mais, fontes não convencionais de proteínas, a fim de aumentar o suprimento protéico mundial. A atenção está voltada às proteínas de origem vegetal e aos problemas que acompanham sua purificação com a eliminação de contaminantes e de substâncias antinutricionais.

Apesar de grãos de cereais serem tidos como os alimentos dominantes nos dois terços do mundo subnutrido e conterem proteínas que, geralmente, são deficientes em alguns aminoácidos essenciais. A maior parte dessa fonte protéica vegetal é utilizada na alimentação animal, transformando-se em quantidades muito menores de proteínas animais, sendo sua bioconversão um processo caro e de baixo rendimento, as quais somente a classe sócio-econômica mais elevada consome.

As folhas verdes também são basicamente usadas na

alimentação de animais. Embora a fotossíntese seja a única fonte renovável e não dilapidável de energia e de alimento para o mundo, poucas espécies de plantas comestíveis são usadas em dietas, pois não têm muita aceitabilidade sendo sua importância na alimentação humana inadequadamente reconhecida. Além disso, seu consumo direto está fortemente limitado pela relação proteína/fibra, pela indigestibilidade das paredes celulares, devido ao teor de celulose e por fatores como o sabor, a presença de substâncias tóxicas e antinutritivas.

No entanto, é possível utilizar essas proteínas, se as folhas forem submetidas a processos tecnológicos apropriados que permitam eliminar consideravelmente esses fatores limitantes, que prejudicam o aproveitamento das mesmas proteínas e de outros nutrientes, interferindo em seu metabolismo e na fisiologia dos mamíferos.

A produção de concentrados protéicos de folhas (CPFs) é uma alternativa de tornar estas proteínas diretamente utilizáveis. Várias espécies vegetais são usadas na preparação de concentrados protéicos de folhas, destacando-se as leguminosas que são as principais fornecedoras de matéria-prima. GALOPPINI & FIORENTINI (1985) relataram que os concentrados protéicos de folhas contêm mais metionina que a soja e mais lisina que os cereais, podendo ser comparados, favoravelmente, às proteínas de origem animal.

É importante ressaltar que os interesses estão voltados ao desenvolvimento de sistemas para o fracionamento de forragens

ou colheitas verdes a fim de separar seus componentes (proteínas, lipídeos, fibras, açúcares, óleos essenciais, etc) para diferentes usos (rações, alimentos, medicamentos e cosméticos, etc).

As folhas de cana-de-açúcar são consideradas produtos secundários das safras que são destinadas a outros propósitos e, normalmente, são descartadas na colheita, sendo queimadas, ato que provoca consequências ao ambiente. A extração mecânica das proteínas e outros nutrientes de suas folhas para produção de concentrados protéicos de folhas poderá se tornar um sub-produto do cultivo da cana-de-açúcar, de bom valor alimentício e uma alternativa para evitar as queimadas.

2. OBJETIVOS

Visando a obtenção de uma proteína alternativa, o aproveitamento da grande quantidade de folhas e a tentativa de impedir as queimadas nos canaviais, o presente trabalho apresentou os seguintes objetivos:

GERAL

- Utilizar as folhas de cana-de-açúcar para a obtenção em laboratório de um concentrado protéico de folhas (CPF) e verificar seu potencial na alimentação.

ESPECÍFICOS

- Realizar a extração mecânica das folhas de cana-de-açúcar, colhidas em vários períodos, utilizando água como solvente.

- Precipitar as proteínas por termocoagulação em pH's

diferentes.

- Determinar a composição centesimal aproximada das folhas, do CPF e do Resíduo Fibroso (RF).

- Determinar os teores de minerais, de açúcares, de carotenóides totais e de compostos fenólicos nas folhas, nos CPFs e nos resíduos fibrosos.

- Determinar a composição em aminoácidos das folhas, dos CPFs e resíduos fibrosos e calcular os índices em relação à proteína de referência.

- Determinar a digestibilidade "in vitro" e "in vivo" do CPF.

- Realizar ensaio biológico em ratos para caracterizar nutricionalmente o concentrado protéico de folhas de cana-de-açúcar, através dos índices CEP, RPL e UPL.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Proteínas de folhas

HISTÓRICO

A utilização de folhas das várias espécies vegetais como alimento está muito aquém de suas potencialidades. Muitas dessas espécies e suas variedades ainda não são empregadas, e quando o são, isto é feito por grupos populacionais esparsos. E a exploração de novas espécies é de grande importância, uma vez que serviriam como fontes alternativas de alimentos.

A detecção de proteínas de folhas data de 1773, quando Rouelle, citado por NAGY et alii (1978), demonstrou a formação de um coágulo quando o extrato de folhas era aquecido.

Embora o valor da proteína de folha na nutrição animal fosse reconhecido durante os anos de intervenção de guerra na Europa, pesquisas na extração de proteínas de folhas e da preparação de um concentrado protéico de folhas permanecem virtualmente latentes até os dias atuais. Os trabalhos realizados

por OSBORNE & WAKEMAN (1920) em escala de laboratório, de extração de proteína de folhas, foram logo seguidos por processos patenteados para a separação de grandes quantidades de proteínas de plantas verdes. Entretanto, foi Pirie, citado por NAGY et alii (1978) quem deu um maior impulso a essa fonte de pesquisa a partir de 1942, quando reconheceu o potencial da proteína de folhas para o consumo humano ajudando, assim, a facilitar o racionamento geral de nutrientes no tempo de guerra. Em 1971, Pirie, citado por DAKO (1981), concluiu que poderá ser importante o papel do concentrado protéico de folhas na nutrição de populações de países em desenvolvimento.

MORFOLOGIA E BIOQUÍMICA DAS FOLHAS

A fotossíntese e a biossíntese de proteínas, carboidratos e lipídeos são de grande importância, sendo realizadas nas células do mesofilo. Nessas células, juntamente com o núcleo, estão presentes grande número de cloroplastos, sendo mais de 100 por célula, e milhões de pequenas organelas como as mitocôndrias. Essas organelas estão embebidas em um gel protéico, o citoplasma, que envolve o vacúolo central. Esse vacúolo está cheio de água e ocupa 60 a 80% do volume total da célula. O citoplasma, com suas organelas, contém cerca de 95% das proteínas e somente 20% da água total da célula. A membrana externa ao citoplasma mantém a turgidez da célula que pode ser perdida pelo aquecimento do tecido a 60-80°C, o que desnatura e

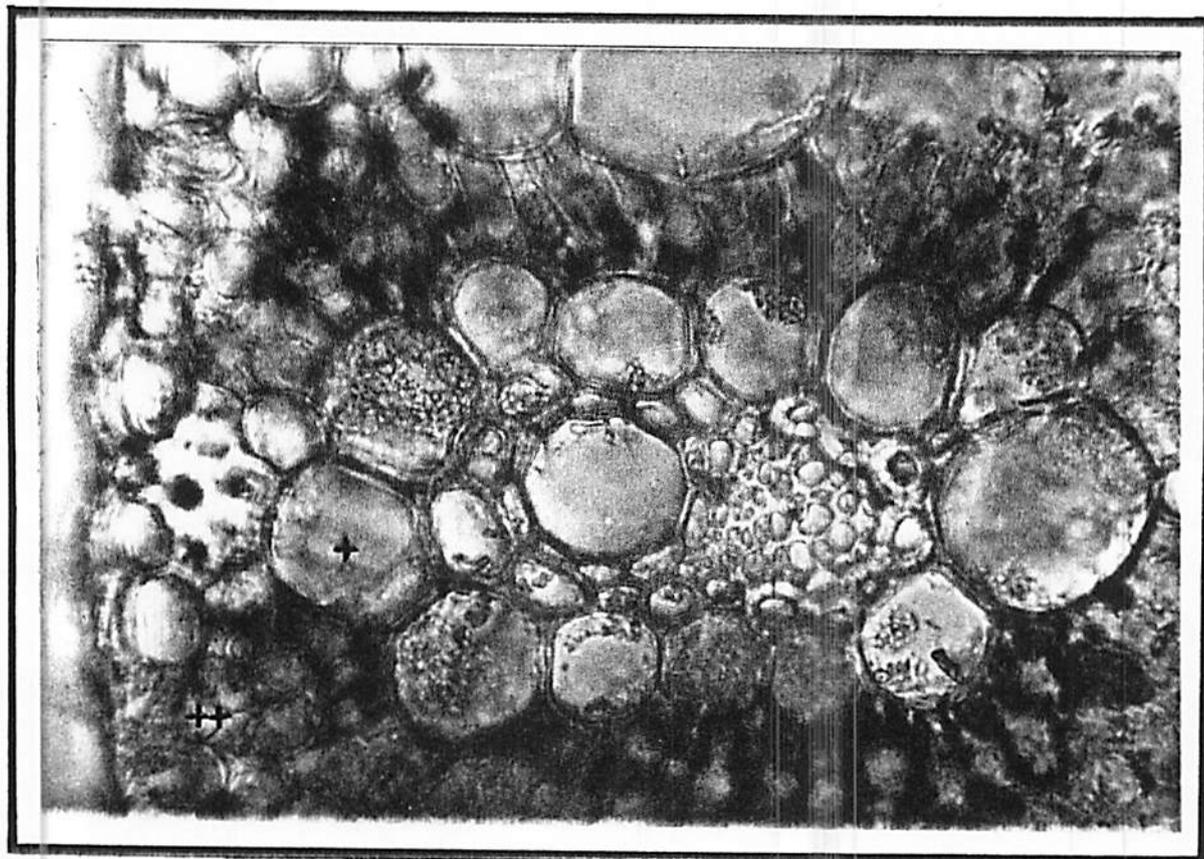
insolubiliza as proteínas, fixando-as no interior da célula. Por essa razão, o suco que é liberado de células aquecidas é composto quase que só pelo conteúdo dos vacúolos (KÖHLER & LYON, 1977).

FIÖRENTINI & GALÖPPINI (1983) verificaram que três quartos das proteínas da parte aérea das plantas verdes, concentram-se nas células do mesófilo e cerca de 80% dessas proteínas concentram-se nos cloroplastos, onde podem dividir-se equitativamente entre fase solúvel e o sistema de membranas lamelares. O gel citoplasmático é formado pela maior parte dos 20% restantes, cerca de 1 a 2% estão no núcleo e menos de 5% estão nas mitocôndrias (Figura 1).

3.2. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente à família botânica das gramíneas, o gênero *Saccharum officinarum* e a espécie *Saccharum officinarum* L. de clima tropical e subtropical. Originária provavelmente da ilha da Madeira, pode alcançar vários metros de altura. Os colmos contêm um sermo açucarado na polpa espessa; as flores muito pequenas, reúnem-se em grandes pendões terminais de um verde prateado; as folhas que saem da base dos nós, são alternadas, de cor verde, característica da variedade e do estado nutricional e fitossanitário da cultura. Apresenta bainha invaginante, podendo apresentar pêlos lignificados,

conhecidos por joçal. A lâmina foliar é lanceolada e em relação ao comprimento é estreita. Entre a bainha e a lâmina foliar pode aparecer um prolongamento chamado aurícula, em um ou em ambos os lados da bainha. A lâmina da folha pode ter comprimento de 60 a



+ células da bainha
++ células do mesofilo

FIGURA 1 - Corte transversal de uma folha de cana-de-açúcar apresentando a estrutura krans ou concêntrica.

150 cm e uma largura que varia de 2,5 a 10 cm (FERNANDES, 1984).

O tipo de solo ideal para cana-de-açúcar é aquele fofo, profundo, nem muito seco e nem muito úmido, com fertilidade razoável e pH variando de 5,0-6,5. Quanto à textura, a cana vai bem em quase todos os tipos de solos, desde os mais argilosos até os arenosos devendo-se, para conseguir bons rendimentos agrícolas, adequar as variedades de cana ao tipo de solo que se disponha. Quanto à estruturação, a distribuição dos componentes do solo deverá ser tal que: 45% de minerais; 25% de ar; 25% de água e 5% de matéria orgânica. Enfim, os solos devem ser férteis, arejados e permeáveis. A plantação é feita em sulcos, onde são colocados os gomos da planta, em geral de meados para o fim da estação chuvosa. A floração começa no outono e a colheita se dá na estação seca, durante um período de 3 a 6 meses. No Brasil, é plantada no sudeste, de outubro a março e colhida de maio a outubro. O primeiro corte (chamado corte da cana-planta) é efetuado depois de 12 ou 18 meses. Os cortes subsequentes, em número de 2 ou 3, realizam-se em intervalos de 12 meses entre cada corte. De acordo com as condições de produção, o rendimento médio anual brasileiro é de 60 toneladas por hectare (RODRIGUES et alii, 1976). O Brasil em 1989 colheu 261 milhões de toneladas em 4,1 milhões de hectares.

3.3. Aspectos bioquímicos da Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase

A ribulose 1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (RuBisCo), envolvida na fotossíntese, representa a maior parte das proteínas das folhas de vegetais e constitui uma das proteínas mais abundantes do planeta. É a principal proteína da fração branca contida no segundo estágio de precipitação (obtida após a separação das proteínas contendo clorofila) e tem sido identificada por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE). Esta enzima constitui a principal proteína solúvel do cloroplasto.

A RuBisCo cataliza a carboxilação da ribulose bifosfato no ciclo de Calvin e a oxigenação dos muitos substratos no decorrer da fotorespiração. Essas duas reações competem entre si para determinar o rendimento do mecanismo fotossintético de várias plantas superiores (ROY, 1989).

AKAZAWA (1985) sugere que a RuBisCo tem uma grande importância para a prosperidade humana porque ela é a enzima chave na fixação do CO₂, que por sua vez precede a produtividade das plantas cultivadas. Mas, paradoxalmente, a atividade oxigenase inerente desta enzima constitui a parte essencial da fotorespiração, contrabalançando a formação de compostos de carbono pela fotossíntese e limitando a produtividade da biomassa. Apesar da natureza enigmática da RuBisCo, recentes

pesquisas visam desenvolver a biologia molecular, tais como a mutagênese do sítio-direto da RuBisCo, a fim de modificar a estrutura molecular dessa proteína-enzima; eventualmente, realçando a sua eficiência na fixação de CO₂. RuBisCo é muito importante quando refere-se aos fatores limitantes na assimilação fotossintética do carbono e os diversos ensaios experimentais relativos a manipulação genética deste sistema, provavelmente poderão modificar e intensificar a produtividade das plantas.

Segundo ELLIS (1990), RuBisCo é uma molécula oligomérica consistindo de oito grandes subunidades (PM = 52000) e 8 pequenas subunidades (PM = 14000) e cada uma das grandes subunidades carrega um sítio ativo. RuBisCo direta ou indiretamente possui uma regra vital no metabolismo de todas as células.

PHELOUNG & BRADY (1979) estudando a extração de proteínas em quatro variedades de capins tipo C₄, utilizaram uma solução tampão neutra para criar condições que inibem a troca oxidativa. Encontraram valores de 26-30% para a proteína solúvel da proteína total e o teor protéico da Fração I ou RuBisCo foi de 11 a 16% da proteína solúvel.

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

Determina-se a qualidade nutricional de uma proteína pela quantidade, disponibilidade e proporção dos aminoácidos essenciais e da presença em quantidades suficientes para utilização ideal de aminoácidos não essenciais (WOLZAK et alii, 1981). Assim, o valor nutricional das proteínas é provavelmente mais limitado pela sua digestibilidade do que pelos teores de aminoácidos.

A presença de proteína com atividade biológica, principalmente as que possuem atividade enzimática de hidrólise e de oxidação foi estudada por diversos autores (FINLEY et alii, 1980; TOZZI et alii, 1981; WHEELER & FINLEY, 1981; ERIKSSON, 1982; DOUILLARD, 1985).

As rotas metabólicas secundárias nos vegetais promovem a biossíntese de famílias de substâncias como os alcalóides, os polifenóis ou as saponinas que são caracterizadas por conterem esqueletos de carbono os quais possuem substitutos com funções alcoólicas, fenólicas ou carboidratos e podem formar glicosídeos (MONTIES, 1981).

Um grupo importante de fatores antifisiológicos, os inibidores de proteases, foi constatado pela primeira vez nas forragens de alfafa desidratada de trevo. Segundo MONTIES (1981), a presença de proteases nos CPFs pode ser consideravelmente

diminuída no processo de obtenção, pois as mesmas são desnaturadas pela ação do calor ou podem também ser eliminadas pela sua solubilidade em água. As lectinas, por exemplo, sendo proteínas de alto peso molecular, são capazes de formar complexos com compostos de origem vegetal podendo ser altamente tóxicas e diminuir o valor biológico das proteínas vegetais não cozidas; essa toxicidade pode ser minimizada com o tratamento térmico.

Outro efeito antifisiológico pode ser causado pela peroxidação dos lipídeos, os quais ocasionam alterações no sabor e valor nutritivo. A degradação da cisteína em presença de ácidos graxos peroxidados, assim como do triptofano livre pelos hidroperóxidos de ácido linoléico e da histidina, foram estudados por MARION & DOUILLARD (1985). Estes mesmos autores mencionam que as proteínas, em presença de lipídeos oxidados, podem ser polimerizadas. Essa reação ocorre mediante ação de um intermediário, o aldeído malônico, que é produzido pela degradação de ácidos graxos polinsaturados.

Os demais fatores que diminuem a digestibilidade das proteínas de folhas são:

- possibilidade de redução do teor ou da disponibilidade metabólica de um ou mais aminoácidos, por exemplo, o aquecimento acima de 100°C tem efeito deletéreo sobre a proteína podendo tornar a lisina totalmente indisponível;

- algumas organelas das células podem atuar sobre as proteínas durante a extração, reduzindo a digestibilidade das mesmas por enzimas;

- a inativação de substâncias nocivas presentes no material, como antimetabólicos, pode diminuir a digestibilidade, podendo essas toxinas serem removidas por lavagens sucessivas e aquecimento do material;

- formação de substâncias deletéreas durante o armazenamento.

A adição de agentes redutores, como o metabissulfito, contribui para melhorar a qualidade nutricional dos concentrados, pois diminuem a ação da polifenoloxidase evitando a oxidação dos aminoácidos sulfurados durante o processamento (FIORENTINI & GALOPPINI, 1983).

HORIGOME et alii (1983) consideram que as variações observadas na qualidade das proteínas foliares são consequência de fatores que afetam diretamente a aceitabilidade e a digestibilidade. Os fatores relacionados com a aceitabilidade são provenientes do "flavor" indesejável.

COMPOSTOS FENÓLICOS

- Taninos

No processo de desintegração celular ocorre a liberação de polifenóis conjuntamente com as proteínas. São substâncias de grande interesse bioquímico devido a sua grande reatividade e na presença das polifenol-oxidases formam quinonas que por sua vez reagem com as proteínas, formando complexos insolúveis que diminuem a extractabilidade. Além disso, ocasionam a formação de

taninos, diminuindo a digestibilidade (MONTIES, 1981).

Os compostos polifenólicos presentes nas folhas devem-se às rotas secundárias nos vegetais que permitem a biossíntese dessas substâncias. A característica da família dos polifenóis é conterem esqueletos de carbono, os quais possuem substitutos com funções fenólicas e podem formar glicosídeos (MONTIES, 1981).

Os produtos alimentícios derivados de vegetais também contêm substâncias fenólicas (SINGLETON, 1981) que podem ser tóxicas e comprometer a qualidade nutricional de uma fonte protéica (SALUNKHE et alii, 1982).

Os compostos fenólicos são classificados em ácidos fenólicos e derivados, flavonóides, taninos e ligninas. Os taninos possuem pesos moleculares entre 5000 e 3000 e são subdivididos em hidrolisáveis e condensados. Os primeiros recebem o nome de hidrolisáveis porque, sob condições ácidas ou enzimáticas, são hidrolisados liberando carboidrato (geralmente glicose) e ácidos fenólicos (comumente os ácidos gálico ou elágico). Os taninos condensados são resistentes à hidrólise e resultam da condensação de flavonóides, como polímeros de flavan-3-ol, flavan-3,4-diol ou a mistura de ambos. Os ácidos fenólicos são os fenóis com baixo peso molecular, geralmente menores que 500, como os ácidos clorogênico, caféico, ferúlico, gálico e outros. Os flavonóides se subdividem em antocianinas, flavonas, flavonóis, isoflavonóides, neoflavonóides e coumestanos. As antocianinas encontradas comumente na natureza são as cianidinas, peonidinas e petunidinas; entre as flavonas pode-se citar as

apigeninas e os flavonóis, as catequinas e epicatequinas. As ligninas, que também estão presentes em todas as plantas, são polímeros e suas unidades monoméricas derivam-se principalmente do álcool coniferil com sinapil ou p-hidroxicinamil, dependendo da planta (SINGLETON, 1981; SALUNKHE et alii, 1982; ZUCKER, 1983).

Não é precisamente definida a função dos polifenóis em plantas. Algumas substâncias denominadas fitoalexinas, identificadas como polifenóis, são produzidas nos tecidos das plantas quando atacadas por patógenos e inibem estes agressores (KUC, 1976). Geralmente, as plantas respondem a lesões e sua cura acarreta alta produção de polifenóis que se localizam adjacentes à injúria, ocorrendo, ao mesmo tempo, oxidação destes compostos a quinonas, através da ação da polifenoloxidase. O produto de oxidação é mais tóxico que o polifenol original (SINGLETON, 1981).

As atividades fisiológicas e nutricionais dos diversos tipos de polifenóis diferem devido às variedades de suas estruturas (HURRELL et alii, 1982). Das propriedades fisiológicas pode-se citar sabor adstringente, que diminui o paladar do alimento quando muito acentuado. Os animais evitam vegetais com alto teor de tanino. Taninos complexam com proteínas através da formação de múltiplas pontes de hidrogênio entre suas hidroxilas fenólicas e a função carbonila da ligação peptídica da proteína ou através de ligações hidrofóbicas (OH et alii, 1980). O teor de tanino suficiente para diminuir a digestibilidade de dietas é de

1,5% (EGGUM & CHRISTENSEN, 1975).

3.5. Concentrado protéico de folhas

3.5.1. Extração de proteínas foliares

A extração de proteínas das folhas inicia-se com o rompimento das paredes celulares das células do mesófilo não aquecidas, que contêm proteínas não desnaturadas. Na ruptura das paredes celulares promove-se uma mistura de enzimas e substratos que acarreta perda de proteína pela atividade de proteases no material desidratado ou no suco verde e perda de carotenóides pela ação de lipoxidase. Estas reações enzimáticas podem ser inibidas ou retardadas pela elevação do pH até 8 ou por refrigeração, efetuando o processamento com rapidez. Outro fator é que, quando as paredes celulares são rompidas, o conteúdo dos vacúolos mistura-se com o citoplasma e suas organelas. O vacúolo é um reservatório de metabólitos, como os compostos fenólicos, que reagem com as proteínas tornando-as insolúveis (KOHLER & LYON, 1977).

FIorentini & Galoppini (1983) demonstraram que a extração das proteínas de folhas para produzir CPFs destinados à alimentação animal e humana se processa com a utilização de uma tecnologia de fracionamento das folhas, consistindo da operação

mecânica de desintegração que separa o material em duas frações: um suco protéico e um bolo prensado. Com uma extração intensa obtém-se um suco que possui alto teor protéico (30 a 40% com base na matéria seca), o suficiente para tornar as folhas dos vegetais viáveis à produção de CPFs.

Os principais fatores que influenciam a extratibilidade de proteína foliar e conseqüentemente interferem no rendimento de extração são:

- a espécie vegetal, pois plantas de diferentes espécies apresentam diferentes relações proteína/fibra. A extração de níveis mais elevados de nitrogênio protéico só é possível para plantas que evidentemente apresentam maiores teores de proteínas em relação a fibra;

- o estágio de maturação da planta;

- o método empregado para romper as paredes celulares e os cloroplastos;

- a presença de material mucilaginoso;

- o tratamento pós-colheita;

- o pH, pois pode causar mudanças na conformação e estrutura protéica;

- composição do agente extrator empregado e

- o tempo e a temperatura de extração (PARRISH et alii, 1974).

BUTLER (1982) classificou os fatores que afetam a porcentagem da proteína em três categorias:

- os que afetam a eficiência da desintegração e a

extensão da liberação do conteúdo das células;

- os que influenciam a eficiência da prensagem e o grau de separação do suco e da fibra;

- os relacionados à composição química da folha, que determinam a solubilidade das proteínas.

INFLUÊNCIA DA COLHEITA

A colheita antes ou após o momento ideal, mesmo que a diferença seja de poucos dias, pode causar considerável queda no rendimento.

Durante a colheita, a parte das células que se rompem libera enzimas responsáveis pela proteólise que aumenta rapidamente com a elevação da temperatura. DE FREMERY et alii (1973) recomendam que se evite danos às folhas durante a colheita, a fim de se reduzir a liberação das enzimas proteolíticas que são dependentes do tempo pós-colheita e aumentam com a elevação da temperatura. Segundo os mesmos autores, a atividade da enzima é reduzida em pHs alcalinos (pH próximo de 8,0) e, portanto, a adição de hidróxido de amônio na colheita prolongará o tempo de espera para o processamento. Segundo KOHLER & KNUCKLES (1977), inibidores enzimáticos empregados são alternativas para o ajuste do pH.

BYERS (1961) estudou a extratibilidade da proteína de folhas de 60 espécies tendo encontrado resultados variando de 4,8 a 65,8%. Um aumento na extratibilidade do nitrogênio e da

proteína com correspondente aumento na temperatura (25 a 70°C), foi observado por LU & KINSELLA (1972), ao constatarem que maior número de cloroplastos, vacúolos e demais componentes que contém proteína são rompidos com o calor.

INFLUÊNCIA DO pH

Variações na temperatura e no pH podem caracterizar o concentrado protéico de folhas. O tratamento térmico pode aumentar a digestibilidade das proteínas através de sua desnaturação e pode inativar certos fatores antifisiológicos, quando susceptíveis ao calor.

Rotineiramente, o pH do meio de extração fica em torno de 5,5 a 6,0 (natural das folhas) e a alteração do mesmo poderá modificar o rendimento do produto final, interferindo na precipitação protéica e exercendo considerável influência sobre a consistência do coágulo. DE FREMERY et alii (1973) verificaram que o aquecimento a 50 a 55°C, em pH 6,0, por alguns instantes, é suficiente para precipitar toda a proteína "verde" da folha. A acidificação do suco (abaixamento do pH de 6 para 5 ou 4) tem sido sugerida e utilizada ao sobrenadante resultante da primeira etapa de precipitação (após o tratamento térmico), que ainda contém proteínas solúveis para a produção do CPF "branco". Segundo os mesmos autores, a alcalinização no processo de concentração, pode reduzir a atividade da polifenoloxidase. Segundo FINOT (1981) o tratamento alcalino pode destruir a

cistina, a treonina e a serina. Entretanto, menciona que a necessidade de se elevar o pH do suco deve-se ao fato de que grande parte do volume total da célula é ocupado pelo vacúolo, cujo conteúdo é ácido; quando a membrana que separa o protoplasma do vacúolo é rompida na operação de moagem, estabelece-se uma condição ácida causando a coagulação das proteínas solúveis e a agregação das estruturas particulares dificultando a extração das proteínas.

A amonização da alfafa até pH 8,5 reduz as perdas de carotenos e xantofilas durante o aquecimento do suco aumentando a extração protéica se a condição alcalina for mantida. SPENCER et alii (1971) mencionam a amonização por contato direto, precipitação a 85°C por injeção de vapor e, posteriormente, a decantação e passagem em prensa hidráulica.

A extração máxima a pH 12 foi mencionada por BETSCHART & KINSELLA (1973), embora tenham sugerido que as extrações sejam feitas entre pH 7 e 8, porque o aumento na solubilidade, causado pela alcalinização adicional, não compensa a possível desnaturação protéica final. Em trabalhos que utilizam tampões, a fim de controlar a acidez provocada durante a maceração devido a liberação de ácidos orgânicos dos vacúolos, os mesmos tiveram efeito positivo na extração das proteínas de alfafa. Entretanto, LU & KINSELLA (1972) verificaram que a extratibilidade da proteína de alfafa não é alterada pelo uso de soluções tampões. Com a precipitação de proteínas em larga escala, usando normalmente o aquecimento como agente de coagulação, obtém-se um

coágulo com melhor textura do que naquele obtido exclusivamente por acidificação, além do que facilita a operação de filtração. PIRIE (1978) sugere a precipitação das proteínas a 75-80°C e leve acidificação (até valores de pH pouco menores que 6).

3.5.2. Obtenção de proteínas foliares

ESPÍNDOLA (1987) ilustrou a obtenção de CPFs indicando os subprodutos de extração, a composição de nutrientes de cada fração e suas aplicações, o que se pode observar na Figura 2.

Os diversos processos para obtenção de CPFs foram desenvolvidos com uma variável complexidade de acordo com o objetivo de cada um, desde a produção de suco verde desidratado até à obtenção de proteínas cristalizadas. O método generalizado, para a maior parte desses processos, envolve uma extração da proteína mediante a ação combinada do solvente e o rompimento celular com uma separação mecânica das proteínas do suco após sua coagulação. A parte fibrosa é separada do suco por métodos convencionais de centrifugação ou prensagem.

O suco extraído pode ser tratado com vapor direto a diferentes temperaturas para fracionar termicamente as proteínas. Também pode ser empregado um método utilizando a precipitação isoelétrica e/ou termocoagulação para obter proteína total (não fracionada). Atualmente tem-se estudado a utilização de poliele-

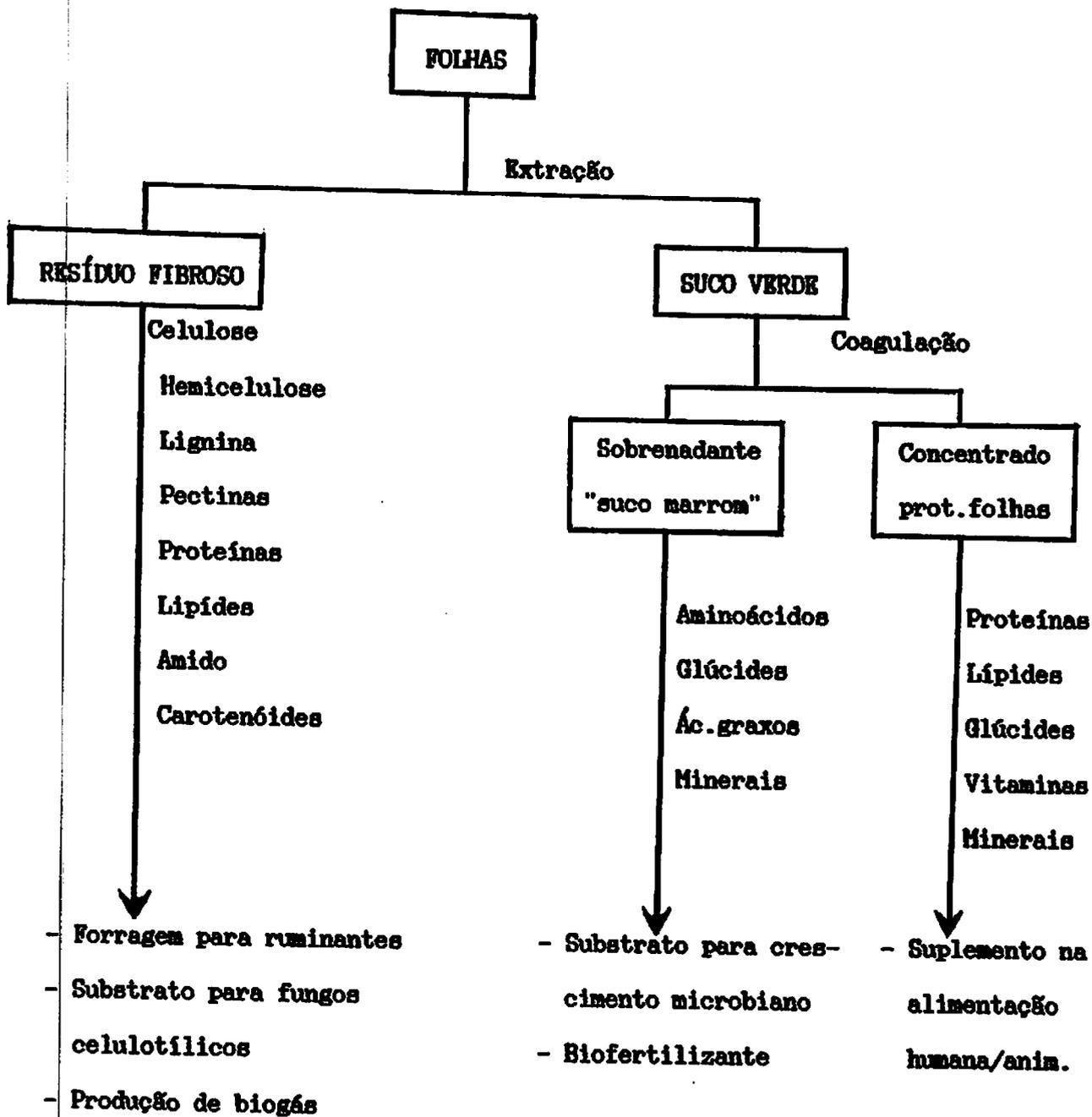


FIGURA 2 -Esquema de obtenção do CPF indicando os subprodutos de extração, a composição de nutrientes de cada fração e suas aplicações (ESPÍN-DOLA, 1987).

trólitos.

Geralmente, os CPFs são definidos como o produto de coagulação da suspensão coloidal verde dos cloroplastos, que é composta de sais solúveis, aminoácidos, proteínas e outras substâncias. Esse coágulo é obtido por aquecimento ou acidificação e separado por flotação, centrifugação e, posteriormente seco. As proteínas assim obtidas podem ser desidratadas, aplicando diferentes métodos de acordo com a qualidade final do produto que se deseja.

HUMPHRIES (1982) verificou que a extração depende, em grande parte, do grau da desintegração celular que libera as proteínas contidas nos diferentes compartimentos da célula. Normalmente, o rompimento celular ocorre de quatro maneiras: por impacto, por corte e pela ação de pressão diferencial, ou ainda pela combinação destes princípios.

A extração da proteína foliar por meio de solventes orgânicos, os quais removem a clorofila e lipídeos foi estudada por vários autores (MORRISON & PIRIE, 1961; PARRISH et alii, 1974; BRAY et alii, 1978).

Estes solventes melhoram a estabilidade do produto e os mais usuais são: acetona e butanol; os mais promissores para a extração em grande escala são os propan-2-ol e butan-1-ol com os quais se obtém produtos despigmentados.

KNUCKLES et alii (1980b) estudaram métodos de separação usando floculantes poliônicos, os quais permitem separar do suco protéico o material cloroplasmático sem a aplicação de calor.

BARANIAK et alii (1985), em seus estudos, usaram comparativamente um floculante catiônico e um aniônico para separar a fração cloroplasmática e a citoplasmática da alfafa e verificaram um superior rendimento protéico no processamento com o floculante aniônico, apesar de terem observado uma melhor separação no fracionamento com floculante catiônico.

Um processo utilizando quitosano (poli-3-(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose) a pH 5,0 a 5,5 flocula as proteínas cloroplasmáticas que posteriormente são separadas por filtração ou centrifugação. O floculante em solução pode ser recuperado com a elevação do pH. Assim, a proteína citoplasmática branca pode ser obtida do líquido livre do floculante (HUMPRIES, 1982).

A secagem com circulação de ar quente produz um enegrecimento intenso, assim como também um endurecimento do produto pela transformação da clorofila em feofitina e reações de Maillard. MORRISON & PIRIE (1961) sugerem a secagem dos coágulos protéicos por liofilização e verificaram que este processo não tem as conseqüências do escurecimento e da baixa do valor nutritivo. Entretanto, este processo é inviável economicamente.

A diafiltração e a ultrafiltração são processos de separação e concentração de proteínas de uso generalizado, a níveis comerciais, na obtenção de proteínas vegetais e proteínas do leite. Na ultrafiltração utilizam-se membranas poliméricas porosas e a separação das moléculas é feita de acordo com o peso molecular e a desnaturação das proteínas é de menor grau (KNUCKLES et alii, 1980a; LEWIS, 1982).

As pesquisas efetuadas têm levado ao desenvolvimento de processos modificados, melhorando-os e adaptando-os às condições de cada região. Em várias partes do mundo instalaram-se processos a nível comercial, a fim de se obter CPFs. Nos Estados Unidos, destaca-se o processo Pro-Xan desenvolvido para obter produtos comerciais contendo 40% de proteínas, 300 mg de carotenos e 900 mg de xantofilas por kg do produto seco e são utilizados para rações de aves. O processo Pro-Xan foi descrito por KOHLER & KNUCKLES (1977) e possibilita a obtenção de proteína em grande escala e baixo custo utilizando alfafa picada. A França produz, a partir do processo Franze-Luzerne, CPFs (frações verde e branca) contendo proteínas de 46 e 90%, respectivamente. Outros processos a níveis industriais encontram-se na Inglaterra (Processo Vepex), países escandinavos, Índia e Nova Zelândia.

3.6. Aspectos nutricionais dos concentrados protéicos foliares

3.6.1. Composição química

Os métodos de processamento e a espécie do vegetal usada como matéria-prima são fatores que interferem significativamente na composição química dos CPFs. A sua fração protéica foi objeto de estudo em inúmeras pesquisas e será analisada no subitem relacionado à qualidade da proteína.

Óleos de peixe contendo o ácido graxo omega-3 são muito recomendados por seus efeitos antitrombóticos e lipolipidêmicos. Entretanto, pesquisas realizadas em várias plantas, quantificaram os níveis deste ácido graxo destacando a beldroega (*Portulaca oleracea* L.) como fonte alternativa de ácidos graxos essenciais, principalmente o omega-3 (SIMOPOULOS & SALEN Jr., 1986).

Geralmente os CPFs integrais contêm de 3 a 8% de ácidos graxos e a presença de elevados teores de ácidos graxos essenciais indica que os lipídeos presentes são importantes nutricionalmente pois fornecem energia e nutrientes essenciais. HUDSON & KARIS (1973) estudaram a composição de lipídeos e verificaram que a concentração de ácidos graxos insaturados é alta. Os mesmos autores relacionaram a instabilidade das proteínas foliares durante a estocagem com a quantidade de ácidos graxos presentes.

BARROS (1984) estudando fases vegetativas de leguminosas, demonstrou que, geralmente, durante a vida do vegetal ocorre pequena variação na composição de aminoácidos das folhas de uma mesma espécie quando comparadas em condições diferentes, tais como: idade, clima e tratamentos. Concluiu que a variação é bem maior quando se trata de comparações entre famílias de plantas. Na literatura pesquisada, a maior parte dos dados disponíveis referem-se a CPFs preparados de alfafa.

A composição de aminoácidos das diferentes frações de proteínas foliares foi estudada por diversos autores e, dentre eles, destaca-se HUMPRIES (1982) que evidencia que as proteínas

não fracionadas são geralmente deficientes em aminoácidos sulfurados. Porém, as frações protéicas apresentam teores de lisina superiores ao recomendado pela FOOD AND AGRICULTURE...-FAO/WHO (1973).

Em relação à presença de minerais na preparação de proteínas foliares PIRIE (1978) discute a importância da presença e da acumulação no vegetal, de metais pesados, como o chumbo.

A presença de compostos polifenólicos nas folhas visa interesse em estudos relacionados às características antifisiológicas. A grande reatividade química de substâncias formadoras dos compostos polifenólicos deve-se ao fato de possuírem grupos hidroxilas, agrupamentos fenólicos ou quinônicos e também à presença de anéis aromáticos hidrófobos, os quais formam interações específicas como por exemplo, com o grupo epsilon-amino da lisina, diminuindo a disponibilidade da mesma. DOUILLARD (1985) verificou que os polifenóis são responsáveis pela aparição de cores e sabores marcantes. DANTAS et alii (1990) estudando folhas de leguminosas, verificaram que o teor de polifenóis cresce à medida que as folhas se desenvolvem. Verificaram também uma variação nos resultados de polifenóis entre as espécies estudadas.

Os carotenóides são, geralmente, tetraterpenos (com 40 carbonos) formados por 8 unidades de isopreno (C_5H_8) e possuem nas suas moléculas um sistema de duplas ligações conjugadas, susceptíveis à oxidação e isomerização sob ação de luz, oxigênio, presença de ácidos e metais, peróxidos e enzimas lipolíticas

(BEZERRA, 1990). São pigmentos responsáveis pela cor característica dos vegetais, devido associações com a degradação da clorofila (WATKINS et alii, 1988). As reações dos ácidos graxos oxidados com pigmentos e quinonas foram revisadas por diferentes autores que mencionam, desde a diminuição dos carotenos durante a secagem do produto, devido a oxidação pelos lipídeos oxidados, até as reações sofridas pelos beta-carotenos em presença de linoleato de etilo oxidado com ruptura de cadeia, formação de isômeros e oxidação (HATANAKA et alii, 1978; DOUILLARD, 1981; MARION & DOUILLARD, 1985). Nas folhas, as reações deste tipo produzem compostos que causam aromas característicos, entre os quais se mencionam n-hexanol como constituinte do aroma de erva verde e o cis-3-hexanol e trans-2-hexanol como responsáveis pelos odor de folha (DOUILLARD, 1981).

A importância dos carotenóides para alimentação animal nos produtos foliares e a eficiente utilização dos pigmentos carotenóides para aves poedeiras é evidenciada por SAUVANT (1981) que também menciona os teores de xantofilas nas diferentes matérias primas.

Segundo FIORENTINI & GALOPPINI (1981) os teores de carotenos (387 ppm) e xantofila (913 ppm) do concentrado cloroplasmático de alfafa são bastante elevados.

A estabilidade dos carotenóides, influenciada pelos diferentes tratamentos durante o processamento de CPFs, foi estudada por diversos autores (LIVINGSTONE et alii, 1980; ERICKSSON, 1982). Durante o processo de obtenção de CPFs em que

se utilizam operações tais como a moagem, prensagem e a acidificação do suco, pode ocorrer uma diminuição considerável na estabilidade dos carotenos.

QUALIDADE DA PROTEÍNA

As proteínas das folhas dos vegetais podem ser comparadas favoravelmente com proteínas de origem animal por conterem mais metionina que a soja e um elevado teor de lisina. As relações entre o teor de um aminoácido e os aminoácidos essenciais (A/E) e entre os aminoácidos essenciais e o total de aminoácidos (E/T) são critérios normais usados na avaliação do perfil de aminoácidos. A relação A/E de proteínas foliares só não é comparável com a de outros alimentos no que diz respeito à sua deficiência em metionina. A relação E/T é semelhante à encontrada para o leite (PARRISH et alii, 1974). Segundo BICKOFF et alii (1975), a adição de metabissulfito de sódio na preparação de CPFs contribui para melhorar a qualidade nutricional dos mesmos, por diminuir a oxidação de aminoácidos sulfurados e de substâncias fenólicas.

A biodisponibilidade dos aminoácidos é um parâmetro fundamental a ser considerado na qualidade de uma proteína. A disponibilidade dos aminoácidos é determinada pela configuração da proteína, ligações entre aminoácidos, outros constituintes da dieta e condições fisiológicas do trato gastrointestinal do animal utilizado. Estudos nos quais se tem aplicado hidrólise

enzimática *in vitro* de proteínas com utilização de pepsina e combinação pepsina/pancreatina fornecem bons resultados da qualidade protéica. Ainda assim, é necessário efetuar ensaios biológicos, pois existe a possibilidade da presença de substâncias tóxicas ou inibidoras do crescimento, que são consideradas importantes pois interferem significativamente na avaliação da qualidade nutricional protéica.

3.6.2. Concentrado protéico na alimentação animal e humana

A extração de CPFs para servirem como fonte de alimento vem sendo sugerida e a importância dos CPFs na alimentação animal, principalmente como suplemento de dietas à base de cereais, foi estabelecida por diversos autores através de experimentos realizados com aves, ratos e porcos (SGARBIERI, 1976; NANDA et alii, 1977; HORIGONE, 1985; MANGALAN & SABNIS, 1989).

Concentrados protéicos foliares não têm grande aceitabilidade no consumo humano devido ao seu "flavor" e coloração característicos. Segundo KOHLER & KNUCKLES (1977) a aceitação destes produtos é possível quando incorporados a alimentos fortemente flavorizados e coloridos, capazes de mascarar o "flavor" e a cor verde do CPF.



Dietas contendo leite como única fonte protéica e dietas com a metade do leite substituída por proteínas foliares foram utilizadas em estudos de reabilitação de crianças desnutridas. Os resultados obtidos mostraram que ingestões usuais de nitrogênio (500 mg/kg/dia) produziram uma retenção de nitrogênio igual em ambas as dietas (SINGH, 1971). O mesmo autor verificou o melhoramento da qualidade de uma dieta baixa em proteínas com a adição de CPF em estudos metabólicos com crianças de 10 a 12 anos de idade.

Durante dois anos comparou-se na Índia, a suplementação da dieta habitual com CPFs de alfafa e outras três proteínas comerciais, dentre elas o leite desnatado, em provas com 250 crianças de 2,5 a 5 anos de idade. No final do estudo, o estado geral de nutrição de todas as crianças foi satisfatório. As crianças que receberam a suplementação com CPF de alfafa tiveram melhor crescimento comparadas àquelas que receberam outros suplementos, exceto o leite desnatado (HUMPHRIES, 1982). Ainda na Índia, KAMALANATHAN et alii (1985) obtiveram resultados positivos no desenvolvimento de um programa educacional de nutrição envolvendo 614 famílias, cujo objetivo era popularizar o uso da proteína foliar. Estudos similares foram efetuados em outros países tais como México (OSTROWSKI-MEISSNER, 1985), Jamaica (PARRISH et alii, 1974) e Nigéria (KOHLEK & KNUCKLES, 1977) sempre se obtendo ganho de peso e altura maiores usando dietas suplementadas com CPFs do que as crianças do grupo controle.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Matéria-prima

Foram utilizadas folhas integrais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) da variedade SP70-1143 cedidas pela FAEPE do plantio da Fazenda Palmital em Ijaci-MG. As colheitas foram efetuadas em julho, outubro e dezembro de 1991.

A colheita foi feita no início da manhã e transportada rapidamente para o laboratório; parte das folhas foi utilizada para a determinação de umidade por secagem a 105°C, outra parte foi seca em estufa ventilada a 60°C, moída em moinho elétrico, passada numa peneira de 80 mesh e usada para determinação da composição centesimal aproximada e outras análises. As folhas restantes foram selecionadas livre de danos e injúrias, para a obtenção do Concentrado Protéico de Folhas (CPF) conforme metodologia descrita em 4.2.1.

4.1.2. Estudo nutricional

No ensaio biológico utilizaram-se ratos machos albinos da linhagem Holtzman, recém-desmamados e livres de patógenos, com 22 dias de idade, pesando entre 31 a 35 g, provenientes do biotério do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura de Lavras.

Para o preparo das rações foram utilizados ingredientes comerciais ou quimicamente puros, tais como: óleo refinado de soja, amido de milho (Maizena), caseína, mistura vitamínica e mistura salina.

4.1.3. Reagentes e vidraria

Para o desenvolvimento deste trabalho, utilizaram-se reagentes de grau analítico de diversas marcas como: Merck, Grupo Química, Carlo Erba, Indafarma, Beckman, Quimibrás, Corporation CNBCO, Nutritional Biochemical e ECIBRA. Além de aparelhos e utensílios indispensáveis de laboratório, utilizaram-se vidrarias das marcas Merck, Pyres, Micronal e Tec-Lab.

4.2. Métodos experimentais

4.2.1. Obtenção do concentrado protéico de folhas de cana-de-açúcar

Após a colheita, dois quilos de folhas foram lavadas, pesadas e passadas numa picadeira por duas vezes consecutivas. Foram então trituradas num processador, a fim de destruir as paredes celulares. Após esse procedimento, fez-se uma extração mecânica, segundo LEXANDER et alii (1970) utilizando-se liquidificador em rotação máxima por 10 minutos, com água destilada na proporção de 1:10 (m/v) e 1 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 5% (m/v), pH 6,0, por litro, de modo a obter uma concentração de óxido de enxofre de cerca de 150 ppm (NAGY et alii, 1978). Desta trituração obteve-se uma suspensão que foi filtrada através de um pano de algodão grosso, originando o resíduo fibroso das folhas (RFI) e um filtrado (Suco Verde I). O RF foi novamente triturado com água destilada na proporção de 1:10 (m/v). A suspensão foi filtrada através de um pano de algodão grosso, dando origem ao Suco Verde II e o RFII. Os RFI e II foram reunidos e secos em estufa de ventilação forçada a 60°C por 24 horas. O suco I e o suco II foram reunidos e as porções foram colocadas separadamente em banho-maria a 85°C por 1 hora e o total foi dividido em quatro porções que receberam os seguintes tratamentos:

I - ajustamento do pH do suco para 8 com NaOH 50%;

II - ajustamento do pH do suco para 6 com NaOH 0,1N;

III - ajustamento do pH do suco para 3,5 com HCl concentrado;

IV - sem qualquer ajustamento do pH do suco - pH 5,5-5,8.

Durante o aquecimento, em cada porção do suco, formou-se um precipitado que, depois de resfriado à temperatura ambiente, foi centrifugado a 3500g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o resíduo, denominado CPF, foi lavado com pequenos volumes de água destilada e novamente centrifugado a 3500 g por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o CPF foi transferido para placas de Petri previamente taradas, foi pesado e seco em estufa ventilada a 60°C por 24 horas. Pesou-se também o material após a secagem. Tanto o CPF verde como o RF foram moídos, passados em tamis de 60 mesh e estocados em sacos de polietileno à temperatura ambiente e utilizados dessa forma nas análises posteriores. Assim, das porções de suco quatro amostras de CPFs foram preparadas:

1) proteína coagulada em pH 8 (CPF1): preparada por aquecimento do suco a 85°C depois do ajustamento do pH do suco para 8 com NaOH 50%;

2) proteína coagulada em pH 6 (CPF2): preparada por aquecimento a 85°C depois do ajustamento do pH do suco para 6 com NaOH 0,1N;

3) proteína coagulada em pH 3,5 (CPF3): preparada por

aquecimento do suco a 85°C depois do ajustamento do pH do suco para 3,5 com HCl concentrado;

4) proteína coagulada em pH 5,5-5,8 (CPF4): preparada por aquecimento a 85°C sem qualquer ajustamento do pH do suco verde.

Na Figura 3, apresenta-se o fluxograma para obtenção do concentrado protéico de folhas de cana-de-açúcar.

4.2.2. Métodos analíticos

As análises químicas foram efetuadas nas folhas de cana-de-açúcar, no RF (subproduto de extração) e nos CPF1, CPF2 e CPF3 e CPF4.

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL APROXIMADA

Unidade

Foi determinada pelo método gravimétrico (estufa 110°C) até obtenção de peso constante, segundo ASSOCIATION... - AOAC (1975).

Cinzas

A quantidade de cinza foi determinada pelo método gravimétrico, com incineração a 550°C, até peso constante, AOAC (1975).

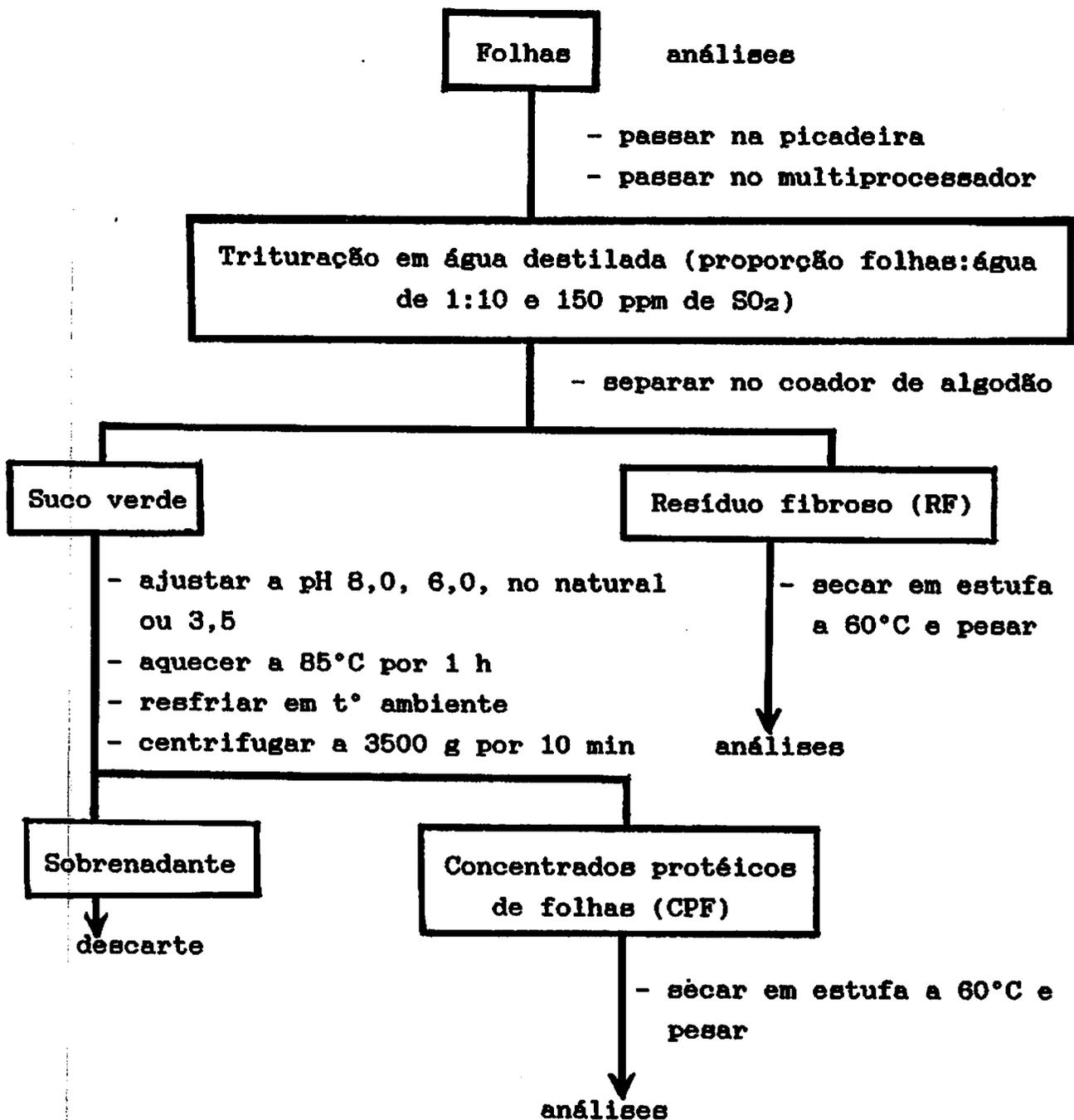


FIGURA 3 - Fluxograma para obtenção do concentrado protéico de folha de cana-de-açúcar.

Proteína bruta

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método micro-Kjeldahl nº 7.025, usando o fator de conversão 6,25 para obter o conteúdo de proteína bruta segundo AOAC (1984).

Nitrogênio protéico

O nitrogênio protéico foi dosado segundo recomendação da AOAC (1980). O método baseia-se, numa primeira etapa, na extração de toda a proteína da amostra com água, seguida da precipitação das mesmas pelo hidróxido de cobre. O material precipitado é submetido à dosagem de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl.

Extrato etéreo

Foi determinado seguindo o método gravimétrico nº 7.062 em extrator contínuo Soxhlet, usando éter etílico como solvente, descrito na AOAC (1984).

Fibras

A determinação de fibras foi realizada seguindo a metodologia do INSTITUTO... - IAL (1977).

Carboidratos

Os carboidratos foram determinados por diferença da soma das determinações anteriores em porcentagem.

Determinação de carotenóides totais

O método utilizado foi baseado no procedimento descrito por HIGBY (1962) e ALMEIDA & PENTEADO (1987). Para a proteção do material com pigmento, utilizou-se frasco de cor âmbar ou revestido com papel alumínio, durante a análise.

- Extração: o material (2g) triturado, foi homogeneizado em liquidificador, por 3 minutos, com hexano (10 ml) e álcool isopropílico (30 ml), sendo a seguir filtrado a vácuo em funil de Buchner. A operação foi realizada com 4 repetições. Os pigmentos extraídos foram transferidos em pequenos volumes para um funil de separação contendo 40 ml de água destilada e 20 ml de hexano onde permaneceram 30 minutos em repouso. Foram lavados sucessivamente com água destilada até a retirada total do álcool isopropílico. Os pigmentos solúveis em hexano foram decantados para erlenmeyer.

- Saponificação: os pigmentos foram saponificados através da adição (30 ml) da solução de KOH 10% em metanol. A mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente, ao abrigo da luz por aproximadamente 16 horas. Após a saponificação, a solução foi transferida em pequenos volumes para um funil de separação, e lavada com água destilada até remoção total de álcali. A solução de pigmento foi transferida para um bequer e adicionada de sulfato de sódio anidro para retirada de água residual.

- Determinação: a solução de pigmentos foi transferida com o auxílio de hexano para um balão volumétrico de 25 ml. Foi

utilizada para determinar a absorvância em espectrofotômetro de duplo feixe, a um comprimento de onda na faixa de 450 nm. O branco utilizado para zerar o aparelho continha somente hexano.

A fórmula utilizada para determinar a quantidade de carotenóides totais por grama de amostra foi a seguinte:

$$C = \frac{A \times 100}{250 \times D \times P}$$

A = absorvância

P = g amostra/diluição (ml)

D = 1 cm

C = mg/100 g

Elementos minerais

As determinações de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, B, Mn e Zn nas folhas, RF e CPFs foram feitas segundo SARRUGE & HAAG (1974). Os extratos da matéria seca foram obtidos por digestão nitro-perclórica, exceto para o nutriente B, cuja extração foi por via seca. P e B foram determinados por colorimetria segundo método da AOAC (1984); Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn por espectrometria de absorção atômica; K por fotometria de chama e S por turbidimetria.

Compostos fenólicos

Foram extraídos de acordo com a técnica proposta por SWAIN & HILLIS (1959) e dosados pelo método colorimétrico de Folin-Denis, descrito pela AOAC (1970), utilizando como padrão o ácido tânico e o resultado registrado em equivalentes de ácido

tânico.

Determinação de amido, açúcares redutores, não redutores e totais

Os açúcares redutores foram extraídos em solução hidroalcoólica a 70% segundo o método de Lane-Enyon, citado pela AOAC (1970) e determinados pela técnica de Somogy, adaptada por NELSON (1944). Os açúcares não redutores foram dosados no mesmo extrato, após inversão ácida e calculados pela diferença entre os valores obtidos após a hidrólise e antes da hidrólise.

Os açúcares totais correspondem à soma dos redutores e não redutores.

Os resultados foram expressos com a percentagem de redutores em glicose e não redutores em sacarose.

4.2.3. Parâmetros nutricionais

Para o ensaio biológico, a amostra foi passada em moinho elétrico, em peneira de 0,84 mm e guardada em sacos de polietileno.

Preparo das dietas

As dietas semi-sintéticas experimental, controle e aprotéica foram preparadas para conter os componentes nutritivos,

segundo recomendações da AOAC (1975), os teores de proteínas, sais minerais e vitaminas, foram 9,0; 5,0 e 1,0%, respectivamente. O balanceamento e o preparo das dietas ao nível protéico de 9,0% deve-se ao fato da dieta apresentar características melhores em relação ao teor de fibras.

Todos os componentes das dietas foram misturados convenientemente, a fim de atingir melhor homogeneidade. Uma vez preparadas, as dietas foram colocadas em sacos de polietileno e conservadas em baixa temperatura (4°C) até o momento de sua utilização.

A composição percentual básica das dietas utilizadas no experimento está apresentada no Quadro 1.

As misturas salina e vitamínica (Quadros 2 e 3, respectivamente) usadas nas dietas, foram preparadas seguindo a técnica recomendada pela AOAC (1975).

A mistura dos CPFs extraídos em pH 6,0 (CPF2) nas diferentes épocas de colheita, foi usada como única fonte protéica na dieta experimental e na dieta controle utilizou-se caseína como fonte protéica.

Foi determinada a composição centesimal aproximada; após o preparo das dietas, usando o método micro-Kjeldahl, conforme descrito em 4.2.2.

QUADRO 1 - Composição centesimal básica das dietas utilizadas nos ensaios biológicos.

Componentes	%
Fonte protéica para conter 9,0% de proteína	9,0
Mistura salina (Quadro 2)	5,0
Mistura vitamínica (Quadro 3)	1,0
Fibra	1,0
Óleo de soja	8,0
Sacarose*	10,0
Amido de milho** q.s.p.	100,0

* Açúcar refinado comercial.

** Amido puro de milho - MAIZENA.

QUADRO 2 - Mistura mineral adicionada às dietas usadas na alimentação dos ratos.

Sal	g/1000 g de mistura mineral
NaCl	139,300
KI	0,790
KH ₂ PO ₄	389,000
MgSO ₄	57,300
CaCO ₃	381,400
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,000
MnSO ₄ .H ₂ O	4,010
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,548
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,477
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,023

FONTE: AOAC (1975).

QUADRO 3 - Mistura vitamínica adicionada às dietas usadas na alimentação dos ratos.

Vitamina	g/kg da mistura vitamínica
"A"	2000 UI
"D"	200 UI
"E"	10 UI
Menadiona	0,5
Colina	200,0
Ácido p-amino-benzóico	10,0
Inositol	10,0
Niacina	4,0
Pantotenato de Cálcio	4,0
Riboflavina	0,8
Tiamina - HCl	0,5
Piridoxina - HCl	0,5
Ácido fólico	0,2
Biotina	0,04
Cianocobalamina	0,003
Amido de milho q.s.p.	100 g

FONTE: AOAC (1975).

4.2.3.1. Métodos Químicos

As análises químicas, exceto digestibilidade da proteína "in vitro", foram realizadas em todos os CPFs. Por questões econômicas, a digestibilidade da proteína "in vitro" foi realizada apenas no CPF2.

- Digestibilidade da proteína "in vitro"

Foi usado, basicamente, o procedimento descrito por AKESON & STHAMAN (1964), que consiste na hidrólise enzimática das proteínas em pH ácido com pepsina, seguida de hidrólise em condições alcalinas com pancreatina. Foram introduzidas algumas modificações no método, tais como: (a) proporção proteína:pepsina igual a 10:1; (b) proporção proteína:pancreatina igual a 7,5:1; (c) precipitação da proteína não digerida com ácido tricloroacético.

- Determinação quantitativa de aminoácidos

O aminograma foi realizado no Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa - MG. O método usado baseou-se na hidrólise ácida do material segundo a técnica de SPACKMAN et alii (1958) e de MOORE & STEIN (1951), empregando HCl 6N por 24 hs a $110^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Como durante a hidrólise ácida ocorre destruição parcial de cistina e metionina, foi realizada uma oxidação prévia, de cistina a ácido cistéico e metionina a metionina sulfona com ácido perfórmico (HIRS, 1967)

Para determinar o triptofano foi aplicada a hidrólise alcalina, segundo a técnica de OPIENSKA-BLAUTH (1963), usando hidróxido de Bário 14% (m/v) por 20 hs a $110^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Determinou-se a absorbância a 545 nm em um espectrofotômetro e o teor de triptofano foi calculado através de uma curva padrão, utilizando concentrações de 0 a 40 μg de triptofano, completando-se para 1 ml com água destilada.

- Escore químico (EQ)

O conteúdo de cada aminoácido essencial de uma proteína é expresso como a percentagem de uma proteína de referência padrão da FAO/WHO (1973). Os aminoácidos que apresentaram menores proporções serão considerados como limitantes. Com base nos valores obtidos nos aminogramas, o escore químico das proteínas foi determinado pela seguinte fórmula:

$$EQ = \frac{\text{mg do aminoácido limitante grama da proteína na amostra}}{\text{mg do mesmo aminoácido por grama da proteína padrão}} \times 100$$

4.2.3.2. Testes biológicos

Para os testes biológicos foram utilizados 46 ratos machos albinos da linhagem Holtzman, recém-desmamados, com 22 dias de idade e pesando em média 32 g. Para os ensaios de Coeficiente de Utilização Protéica e Coeficiente de Eficácia Alimentar (ambos com duração de 28 dias), 2 grupos experimentais foram montados, cada qual constituído por 8 animais. Nos ensaios de Razão Protéica Líquida e de Digestibilidade "in vivo" (ambos com duração de 14 dias) foram necessários 3 grupos experimentais constituídos cada qual, por 5 animais. E no ensaio de Utilização Protéica Líquida (duração: 10 dias), 5 animais constituíram cada

um dos 3 grupos experimentais. Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais de fundo falso, recebendo água e alimentação à vontade ("ad libitum") por um período de 3 dias de adaptação. Colocou-se caixas de papelão abaixo das gaiolas para recuperar a porção das dietas jogada fora pelos ratos, conforme recomendação de PELLETT & YOUNG (1980) para ter medidas mais precisas do consumo de alimento e para a coleta das fezes.

O peso dos animais foi controlado semanalmente e o consumo de alimentos de 3 em 3 dias. As fezes durante a segunda e a terceira semana do experimento, foram coletadas diariamente e conservadas secas para análise de nitrogênio total.

Para a determinação da Utilização Protéica Líquida (UPL) ou NPU (Net Protein Utilization), os animais foram sacrificados, por inalação com éter etílico, e suas carcaças foram pesadas, secas, desengorduradas e pulverizadas para análise do nitrogênio total. O grupo aprotéico foi sacrificado com 14 dias (PELLETT & YOUNG, 1980).

Durante o experimento, a temperatura ambiental do biotério foi mantida a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

- Coeficiente de Eficácia Alimentar

As dietas preparadas foram avaliadas pela determinação do Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) que é definido pela relação entre o ganho de peso dos animais e o consumo de dieta, o qual representa o aumento de peso do animal por grama de ração ingerida (PELLETT & YOUNG, 1980). O CEA é calculado pela seguinte

fórmula:

$$\text{CRA} = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{consumo de dieta (g)}}$$

A proteína do CPF2 de cana-de-açúcar foi avaliada através dos seguintes parâmetros:

COEFICIENTE DE EFICÁCIA PROTÉICA

O CEP (Coeficiente de Eficácia Protéica) ou PER ("Protein Efficiency Ratio") fornece indicações do aumento do peso do animal em função da proteína ingerida, conforme se segue:

$$\text{CEP} = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{consumo de proteína (g)}}$$

segundo AOAC (1975), procedimentos 43.183 - 43.187.

A proteína consumida foi calculada usando-se o teor real de proteína encontrado na dieta. Foram feitas pesagens regulares a cada 7 dias, pelo período de 4 semanas. As pesagens foram feitas a fim de se obter o peso de cada rato e da respectiva dieta consumida.

COEFICIENTE DE EFICIÊNCIA LÍQUIDA DA PROTEÍNA

A razão protéica líquida (RPL) ou Net Protein Ration

(NPR) é determinada pela somatória do ganho de peso do grupo teste e a perda de peso do grupo aprotéico, relacionada com a proteína ingerida pelo grupo teste, PELLETT & YOUNG (1980). O RPL é calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{RPL} = \frac{\text{ganho de peso do grupo teste} + \text{perda de peso do grupo aprotéico}}{\text{consumo de proteína do grupo teste}}$$

COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE DA PROTEÍNA

Foram determinadas as digestibilidades aparente (Da) e verdadeira (Dv) da proteína. A digestibilidade é dada pela relação entre o nitrogênio absorvido e o nitrogênio ingerido pelo animal, onde o nitrogênio absorvido é obtido pela diferença entre o nitrogênio ingerido e o nitrogênio fecal eliminado, segundo PELLETT & YOUNG (1980). As digestibilidades são calculadas pelas seguintes fórmulas:

$$D_a = \frac{NI - NF}{NI} = \frac{NA}{NI} \times 100$$

$$D_v = \frac{NI - (NF - NFe)}{NI} \times 100$$

onde: NA = nitrogênio absorvido

NFe = nitrogênio fecal do grupo aprotéico (nitrogênio endógeno)

NF = nitrogênio fecal dos grupos testes ou controle

NI = nitrogênio ingerido.

UTILIZAÇÃO PROTÉICA LÍQUIDA

A utilização protéica líquida (UPL) ou NPU ("Net Protein Utilization") é dada pela determinação por ensaios de retenção de nitrogênio em que se utilizam dados da determinação de nitrogênio total da carcaça do grupo mantido na dieta contendo a proteína (Grupo I) e no grupo em dieta aprotéica (Grupo II) segundo PELLETT & YOUNG (1980). Entretanto, visto a dieta não conter 10% de proteína e a impossibilidade da determinação do nitrogênio urinário, a relação que permite o cálculo do UPL a partir do nitrogênio da carcaça é a seguinte:

$$\text{UPL} = \frac{\text{N corporal Grupo I} - \text{N corporal Grupo II}}{\text{N consumido pelo Grupo I}} \times 100$$

Grupo I - mantido na dieta contendo 9,2% de proteína.

Grupo II - mantido na dieta aprotéica.

segundo SGARBIERI (1987).

4.3. Análise estatística

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial com CPFs extraídos em 4 pH's e 3 épocas de colheita, com 3 repetições.

Para os resultados das análises químicas obtidas nos CPFs, foram feitas análises de variância, com posterior análise

das diferenças entre médias pelo teste de Tukey a nível de 5%. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e três repetições.

Os resultados dos ensaios biológicos foram submetidos a análise de variância e ajuste das equações de regressão linear para o crescimento dos ratos.

Foram determinados os coeficientes de correlação entre os parâmetros relacionados nos ensaios biológicos.

As análises estatísticas foram realizadas segundo os métodos descritos em COCHRAN & COX (1957) e PIMENTEL GOMES (1982).

Foi utilizado o pacote estatístico SAEG para microcomputadores versão 2,0 (1986) para as análises de variâncias e correlações.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção do CPF e rendimento protéico

O potencial da folha de cana-de-açúcar para obtenção de CPF foi investigado utilizando um único método de extração de proteínas baseados na literatura, o qual indica a utilização de água destilada como meio extrator (LEXANDER et alii, 1970) e a adição de metabissulfito de sódio por auxiliar no processo de extração, inibindo ou diminuindo as reações fenólicas com compostos protéicos (BICKOFF et alii, 1975; EDWARDS et alii, 1978).

A escolha da termocoagulação foi baseada em sugestão de MORRISON & PIRIE (1961) que utilizaram o aquecimento na precipitação das proteínas, tendo em vista o efeito que o calor exerce sobre a consistência do coágulo formado. O pH durante a precipitação exerce considerável efeito qualitativo e quantitativo nas proteínas dos CPFs, sob as mesmas condições de temperatura e tempo de tratamento. O uso de NaOH proporcionou a

condição alcalina para uma redução na precipitação protéica. A precipitação mostrou-se eficaz sob condições de pH ácido, uma vez que o ponto isoelétrico das proteínas de folhas encontra-se entre os valores de 3 e 5, onde a solubilidade das proteínas é mínima.

Os rendimentos médios da extração protéica dos CPFs de folhas da gramínea cana-de-açúcar colhidas em diferentes épocas e preparados com variação de pH estão registrados no Quadro 4. A análise de variância (Quadro 10-Apêndice) mostrou diferenças significativas ($P < 0,01$) entre os teores médios de proteína bruta e entre os valores de rendimento de extração protéica nos CPFs extraídos em diferentes pH's. Entretanto, não mostrou diferenças significativas ($P < 0,01$) entre esses valores e a época de colheita das folhas. Pelo Quadro 10 e 11-Apêndice, nota-se que os teores de proteína bruta e os valores de rendimento de extração protéica não foram estatisticamente diferentes entre os CPFs preparados com folhas colhidas em diferentes épocas. Eles expressam as quantidades percentuais de matéria seca (MS) e proteína dos CPFs em relação às quantidades originais das folhas.

Observa-se que o rendimento foi baixo em todos os CPFs, podendo ser atribuído ao tempo prolongado no processamento da extração mecânica, onde pode ter ocorrido degradação das proteínas pelas enzimas proteolíticas diminuindo o teor protéico final. Portanto, esforços devem ser dirigidos para que se produza um CPF não fracionado com alto rendimento e com propósitos para a alimentação humana e animal.

QUADRO 4 - Rendimento médio de extração protéica de folhas de cana de açúcar colhidas nos meses de julho, outubro e dezembro/91 empregando diferentes pH's antes da termo-coagulação na produção de CPFs.

CPF	Peso (g de MS)	Proteína Bruta (% em MS)	Rendimento protéico (%)	Perdas (%)
1 ^a	1,42	45,03	12,83	28,94
2 ^b	2,77	47,25	26,28	15,49
3 ^c	3,86	42,55	32,98	8,79
4 ^d	2,57	45,75	23,61	18,16

- ^a pH do suco verde ajustado para 8,0 com NaOH 50% antes da coagulação.
- ^b pH do suco verde ajustado para 6,0 com NaOH 0,1N antes da coagulação.
- ^c pH do suco verde ajustado para 3,5 com HCl concentrado antes da coagulação.
- ^d Sem ajustamento de pH (pH natural da folha entre 5,5 a 5,8).

OBS.: - As folhas e o RF apresentaram pesos médios (em g de MS) de 74,42 e 2,90, respectivamente.

- As folhas e o RF apresentaram teores médios de proteína bruta em % de matéria seca de 6,78 e 4,54, respectivamente.

O CPF3 mostrou o melhor rendimento e isso evidencia que, a solubilidade protéica é mínima quando o suco verde tem pH próximo ao ponto isoelétrico. O CPF1 mostrou o menor rendimento devido à condição alcalina do suco verde, no qual a solubilidade aumenta, indicando que a perda protéica (28,94%) pode estar relacionada à proteína solúvel do sobrenadante (Fração I).

TELEK & MARTIN (1983), estudando o CPF do capim Napier com 10,7% de PB, obtiveram um rendimento de extração de 19,7% de proteína. EDWARDS et alii (1978) encontraram para o CPF de alfafa com 58,3% de PB, um rendimento de extração de 12,8% de proteína. Os valores obtidos para o rendimento dos CPFs de cana-de-açúcar, foram similares ao capim Napier e superiores ao do CPF de alfafa não fracionado. O rendimento de extração protéica depende da espécie, variedade, condições de cultivo e da capacidade de regeneração do vegetal após podagem (BYERS, 1965).

Com base nos resultados anteriores e considerando cada etapa desse processo apresenta-se as seguintes observações:

- a extração seria eficiente, na medida que o teor de PB fosse recuperado a uma melhor extração, pois romperiam eficientemente as células e suas organelas e promoveriam a separação eficaz tanto da fração fibrosa do suco verde, como do coágulo protéico;

- a filtração usando pano de algodão para separar o RF do suco verde, não foi totalmente eficiente, pois os vestígios de RF passaram através do pano e aumentaram o teor de fibra bruta nos CPFs;

- a centrifugação é a técnica mais usada para coletar o coágulo protéico e a separação em rotação 3500g foi muito eficaz;

- a secagem consiste na técnica de preservação mais comum para CPFs. Entretanto, a secagem com circulação de ar quente provocou um endurecimento e escurecimento nos CPFs de cana-de-açúcar devido às reações de Maillard e à transformação da clorofila em feofitina.

5.2. A folha de cana-de-açúcar e a produção de CPFs e RF

Economicamente é favorável usar como fonte de proteínas, folhas que são produtos de propósitos já estabelecidos, como por exemplo, folhas de cana-de-açúcar; mesmo utilizando folhas velhas, que podem tornar pior o extrato quando comparado com aquele que utiliza folhagem jovem. As folhas verdes são ricas em proteínas, mas sua utilização direta é limitada por causa da presença de fibras celulóticas que não são digeridas pelo organismo de monogástricos. Entretanto, a produção de CPFs permite a utilização das proteínas e outros nutrientes da folha como alimento, contendo baixo teor de fibra e boa qualidade nutritiva.

O RF, que é um subproduto da extração de proteínas foliares, tem-se destacado pelas potencialidades de sua utilização. Considerado o maior produto de fracionamento, o RF

recupera uma fração considerável da matéria seca e da proteína; suas qualidades tais como: ser tão produtivo quanto a cultura original, usada de maneira tradicional e ser boa fonte de minerais, são apreciáveis na alimentação de ruminantes (SILVESTRE-MARINHO & JOKL, 1983). Além disso, pode ser usado como biogás ou para a produção de combustível liquefeito e também como base para a produção de papel.

Considerando que a extração de proteínas de folhas não é vantajosa sem uma utilização propícia do RF (TASAKI, 1985), tornou-se importante apresentar-se nesse trabalho, uma vez que o processo de extração protéica foi eficiente, a análise química do RF e também das folhas de cana-de-açúcar para futuros estudos.

5.2.1. Composição centesimal aproximada da folha e do RF

A Figura 4 ilustra a composição centesimal aproximada das folhas, RF e do CPF2 de cana-de-açúcar com base na matéria seca. O conteúdo de proteína bruta resultou em valores de 4,54 e 6,78 para o RF e para as folhas, respectivamente. A cifra de proteínas nas folhas foi um pouco superior quando comparada com a mencionada por ABO BAKR et alii (1982) que encontraram 6,04% para folhas de cana-de-açúcar dessa mesma variedade. Os mesmos autores, estudando a composição dessas folhas, encontraram 6,65% de extrato etéreo, 40,4% de açúcares totais, 22,4% de fibra bruta

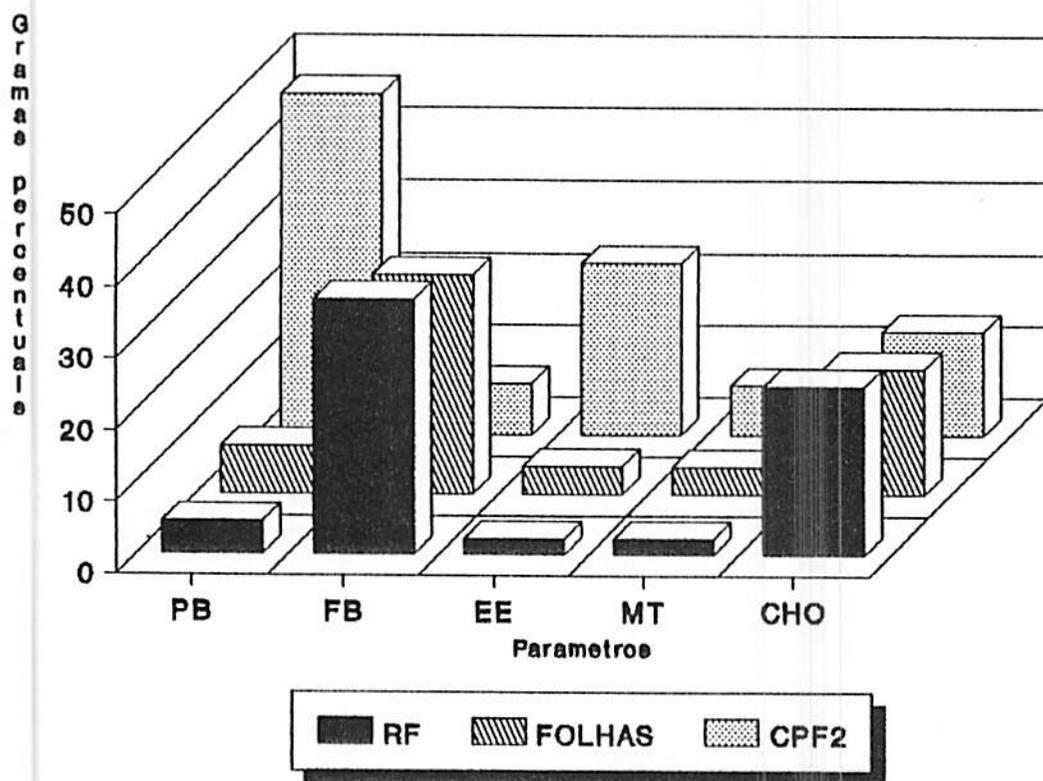


FIGURA 4 - Composição centesimal aproximada nas folhas, resíduo fibroso (RF) e concentrado protéico de folhas (CPF2) de cana-de-açúcar, Out./91. ESAL/DCA, Lavras-MG.

e 19,5% de cinzas. A percentagem de proteína extraída nas folhas varia consideravelmente dependendo da espécie, práticas agrícolas e sobre o processo mecânico de maceração empregado nas mesmas. PIRIE, em 1971, estimou que aproximadamente 40 a 60% de proteína numa colheita forrageira, como a alfafa, pode ser extraída.

Observa-se ainda pela Figura 4, que as folhas de cana-de-açúcar e o RF foram características em apresentarem uma redução dos níveis de cinzas (3,89% e 2,14%, respectivamente) quando comparados com outras folhas e RFs (SILVESTRE-MARINHO & JOKL, 1983; CARLSSON et alii, 1984; BARRY & MANLEY, 1986). Como era esperado, o RF de cana-de-açúcar apresentou elevado teor de FB (35,5%) o que excedeu aos dos RFs de leguminosas que apresentaram teores de 26,6 a 32,4% de fibra bruta (ESPÍNDOLA, 1987). Em índices elevados de fibras, podem estar contidos níveis elevados de lignina que prejudicam a palatabilidade e a digestibilidade. Segundo SILVESTRE-MARINHO & JOKL (1983) a análise da composição da fibra dietária revela que a celulose e a hemicelulose são os principais componentes da fibra e são muito importantes para o animal. No rúmem, a fermentação desses carboidratos estruturais é processada, transformando-os em ácidos orgânicos que são absorvidos e metabolizados no fígado pela via da neoglicogênese. Assim, os ruminantes obtêm a glicose para suprir suas necessidades energéticas e fisiológicas. No presente trabalho o valor observado para EE (2,58%) no RF foi inferior ao da folha de cana-de-açúcar (3,99%).

ESPÍNDOLA (1987) analisou o RF de uma outra gramínea, o capim Napier, registrando a seguinte composição: umidade (7,5-10,1%); PB (5,3-7,8%); cinzas (4,3-7,9%); EE (1,1-20,3%) e FB (26,0-34,9%). As variações observadas com a composição do RF de cana-de-açúcar são devidas às diferenças de espécies e as condições de cultivo das mesmas.

5.2.2. Elementos minerais

Os minerais foram avaliados nas folhas e RF de cana-de-açúcar (Quadro 5). Observa-se que as folhas apresentaram bom teor de cálcio e que este valor manteve-se elevado no RF.

QUADRO 5 - Teores médios de elementos minerais nas folhas e resíduo fibroso (RF) de cana-de-açúcar. Nov./91. ESAL/DCA, Lavras-MG.

Amostra ^a	Macronutrientes (%) ^b					Micronutrientes (ppm) ^b				
	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Zn	Fe	Mn	B
Folhas	0,09	1,11	0,23	0,12	0,11	8,57	17,54	854,70	33,98	4,39
RF	0,04	0,22	0,31	0,10	0,08	9,00	12,44	320,92	17,74	5,05

^a Matéria seca

^b Média de três determinações.

Os teores de minerais, em geral, para as folhas mostraram índices menores quando comparados com os obtidos para folhas de cana-de-açúcar por ORLANDO FILHO et alii (1975) e BAWA & YADAV (1986), principalmente o conteúdo de fósforo que mostrou-se reduzido tanto nas folhas como no RF. SILVESTRE-MARINHO & JOKL (1983) observaram que os RFs de vegetais verdes são boas fontes de minerais. Com relação aos metais pesados Cu e Zn, os resultados para folhas e RF foram mais baixos quando comparados com os limites máximos de tolerância em diversos alimentos consumidos pelo homem/dia (30 e 50 ppm, respectivamente), segundo BICK (1985).

O enxofre é o componente dos aminoácidos essenciais metionina, cisteína, cistina, os quais encerram cerca de 90% do total de S da planta, bem como está ligado às vitaminas biotina e alamina (Allaway & Thompson citados por VITTI & NOVAES, 1986).

Em solos submetidos às queimas periódicas, é de esperar que os teores de enxofre situem-se aquém das necessidades dos vegetais (VITTI & NOVAES, 1986). Respostas de forrageiras ao enxofre são esperadas em solos com esta característica. Entretanto, a folha de cana-de-açúcar apresentou teores baixos de enxofre (0,11%).

Por apresentarem baixa capacidade de troca catiônica das raízes, as gramíneas são eficientes na remoção de K do solo, sendo normalmente mais eficientes na absorção de cátions monovalentes. De acordo com GOMIDE (1976) a composição mineral de gramíneas varia conforme os seguintes fatores:

- idade da planta - os teores de N, P e K diminuem com o avanço da idade; de Ca, Mg, Zn e Fe aumentam com a idade e concentram-se no caule;

- solo e adubação - o teor mineral depende do tipo de solo e de sua fertilidade;

- estação do ano e sucessão de crescimentos - fatores estacionais como luminosidade, temperatura e pluviosidade podem levar a variações na composição química das gramíneas durante o ano.

5.2.3. Amido, açúcares totais, redutores e não redutores

No Quadro 6 são mostrados os valores para amido, açúcares totais, açúcares redutores e não redutores obtidos das folhas e do RF de cana-de-açúcar. Os teores de amido encontrados tanto nas folhas e como no RF de cana-de-açúcar são compatíveis com a literatura que menciona para as folhas e RF de *Ipomoea aquática*, 4,0 e 4,2%, respectivamente (MISRA et alii, 1985). Todos os valores de açúcares encontrados para as folhas foram superiores aos do RF. Entretanto, os valores encontrados para ambos mostraram-se muito baixos quando comparados com ABO BAKR et alii (1982) que encontraram valores de 40% aproximadamente de açúcares totais nas folhas de cana-de-açúcar.

QUADRO 6 - Valores médios de amido, açúcares não redutores (% de sacarose), redutores (% de glicose) e totais obtidos nas folhas e RF de cana-de-açúcar, Dez./91. ESAL/DCA, Lavras-MG.

Amostra	Parâmetros ^a			
	Ác.não redutores ^b (sacarose)	Açúcares redutores ^b (glicose)	Açúcares ^b totais	Amido (%)
Folhas	0,09	1,20	1,28	3,92
RF	0,07	0,68	0,75	4,16

^a Média de três determinações.

^b % em peso úmido.

5.2.4. Carotenóides totais

Recentemente, foi noticiado que vegetais verdes e amarelos possuem considerável efeito protetor ao risco de câncer e isso, deve-se ao elevado conteúdo de carotenóides, especialmente de beta-caroteno. O mecanismo pelo qual o beta-caroteno pode agir prevenindo o câncer, pode estar relacionado a essa pro-vitamina A natural ou a alguns efeitos específicos do próprio caroteno.

A Figura 7 (pág. 84) ilustra os valores médios de



carotenóides totais obtidos das folhas e do RF de cana-de-açúcar. No presente trabalho, o teor de carotenóides nas folhas foi de 8,83 (mg/100 g, peso úmido). Observa-se que no RF este componente foi reduzido (5,8 mg/100 g, peso úmido) mas, ainda assim, esse teor enriquece sua qualidade, tornando-o boa fonte de carotenóides. Geralmente, observa-se que os pigmentos lipossolúveis, carotenos e xantofilas, estão enriquecidos nos CPFs. Como fonte de pro-vitamina A e de pigmentos, este produto favorece, quando ingerido pelas aves, a pigmentação da pele e do ovo (SATTERLEE, 1980).

5.2.5. Compostos fenólicos totais

No Quadro 7 encontram-se os valores para compostos fenólicos totais. Os grupos NH_2 e SH dos aminoácidos são alvos primários de reações enzimáticas geradoras de quinonas. Os aminoácidos essenciais lignina, cistina e metionina são susceptíveis a essas reações e são geralmente limitantes nas proteínas vegetais. Estes compostos potencialmente tóxicos são considerados antifisiológicos e originam-se do nitrogênio total das folhas, podendo afetar uma ou mais etapas do metabolismo animal ou humano e podem diminuir a qualidade dos alimentos. Assim, é muito importante a determinação de polifenóis tanto nas folhas e resíduos fibrosos como no CPF.

Quadro 7 - Teores percentuais de compostos fenólicos das folhas e RF de cana-de-açúcar. Dez./91. DCA-ESAL, Lavras-MG.

Amostra ^a	Teor de fenólicos (mg/100 g) ^b			
	Metanol	Metanol (50%)	Água	Polifenóis totais
Folhas	429,0	543,4	271,7	1244,1
RF	486,2	586,3	300,3	1372,8

^a Matéria seca

^b Média de duas determinações.

Pode-se verificar que o maior teor de polifenóis foi constatado no RF (1,4%) quando comparado com as folhas de cana-de-açúcar (1,2%). Entretanto, esses valores podem contribuir para diminuir a digestibilidade, interferindo no aproveitamento e limitando suas utilizações diretas. Como os valores para polifenóis totais foram obtidos pelo somatório de taninos extraídos em diferentes solventes, os mesmos podem superestimar estes dados. Assim, é importante ressaltar o teor de taninos extraídos em metanol 50%, isto é, os taninos di-oligoméricos que são responsáveis pela adstringência no alimento, que alcançaram valores de 0,54% e 0,59% para folhas e RF, respectivamente.

5.2.6. Aminoácidos

O Quadro 8 apresenta as concentrações de aminoácidos presentes nas folhas e no RF de cana-de-açúcar.

A maior parte de proteína das folhas são enzimas envolvidas na fotossíntese e outras atividades biológicas. Isto significa que as proteínas foliares têm uma composição em aminoácidos uniforme e que todas as folhas podem ser consideradas como fonte potencial para a produção de CPFs (TASAKI, 1985).

Este quadro mostra que os aminoácidos essenciais estão presentes e que o ácido glutâmico foi o aminoácido predominante nas folhas e no RF seguido depois pelo ácido aspártico; o qual é apontado como principal composto transportador de nitrogênio nos vegetais.

Do ponto de vista nutricional, a folha de cana-de-açúcar é deficiente nos aminoácidos essenciais, isoleucina, metionina + 1/2 cistina e lisina. O RF comparado com a proteína de referência da FOOD... - FNB (1980), mostrou-se pobre nos teores de todos os aminoácidos essenciais, exceto treonina.

BICKOFF et alii (1975) observaram que as folhas de leguminosas, especialmente alfafa, igualmente, são deficientes nos aminoácidos sulfurados. O escore químico estabelece uma comparação entre a quantidade de cada aminoácido dieteticamente indispensável, da proteína em estudo com o aminoácido correspondente de uma proteína padrão (SGARBIERI, 1987).

QUADRO 8 - Composição em aminoácidos das folhas e RF de cana-de-açúcar em comparação com a proteína de referência da FNB (1980). Dez. 1991. DCA-ESAL, Lavras-MG.

Aminoácidos ^b	Amostras		Proteína de referência ^c
	Folhas ^a	RF ^a	
Metionina	1,49	1,59	
1/2 Cistina	0,35	0,25	
Metionina+Cistina	1,84 L	1,84 L	2,6
Isoleucina	3,97 L	3,34 L	4,2
Leucina	8,51	6,88 L	7,0
Lisina	4,79 L	4,41 L	5,1
Fenilalanina	5,04	3,68	
Tirosina	2,90	1,75	
Fenilalanina+Tirosina	7,94	5,43 L	7,3
Treonina	4,89	3,80	3,5
Triptofano	1,10	0,80 L	1,1
Valina	5,37	3,83 L	4,8
Alanina	6,70	5,53	-
Histidina	1,63	1,36	-
Arginina	5,29	3,42	-
Ác. Aspártico	8,59	7,12	-
Serina	4,54	3,79	-
Ác. Glutâmico	10,99	9,23	-
Prolina	4,64	4,34	-
Glicina	5,04	4,22	-
Total aas. essenciais	38,41	30,34	35,60
	3 limitantes	7 limitantes	

^a matéria- seca desengordurada

^b expresso em g/100g proteína

^c FONTE: FOOD NUTRITION BOARD, 1980

L - Aminoácido limitante.

Portanto, as análises das limitações da proteína das folhas e do RF de cana-açúcar, foram feitas através do escore de aminoácidos em relação ao padrão da FAO/WHO, 1973.

Embora as folhas tenham apresentado escores um pouco maiores que os do RF para os aminoácidos sulfurados e lisinas, estes mostraram-se limitantes (aminoácidos sulfurados = 1º aminoácido limitante, lisina = 2º aminoácido limitante) e Isoleucina = 3º aminoácido limitante.

O RF apresentou fenilalanina + tirosina como limitante primário porém, apresentou a valina como aminoácido limitante secundário e outros.

5.3. Composição química aproximada no CPF de cana-de-açúcar

Na Figura 5 e no Quadro 9 observa-se a composição centesimal dos CPFs de cana-de-açúcar obtidos por termocoagulação a 85°C em diferentes pHs do suco verde. Verifica-se que os CPFs de cana-de-açúcar apresentaram as seguintes faixas de composição: umidade (4,83 - 6,84%); PB (42,55 - 47,25%); FB (4,05 - 7,21%); EE (20,83 - 24,48%); cinzas (5,89 - 10,16%) e CHO (14,58 - 23,05%). O CPF2 apresentou o maior conteúdo protéico (47,25%).

No presente trabalho, todos os CPFs extraídos mostraram teores mais elevados de proteína bruta que o teor demonstrado por BYERS (1961). Este mesmo autor, classificou a folha de cana-de-

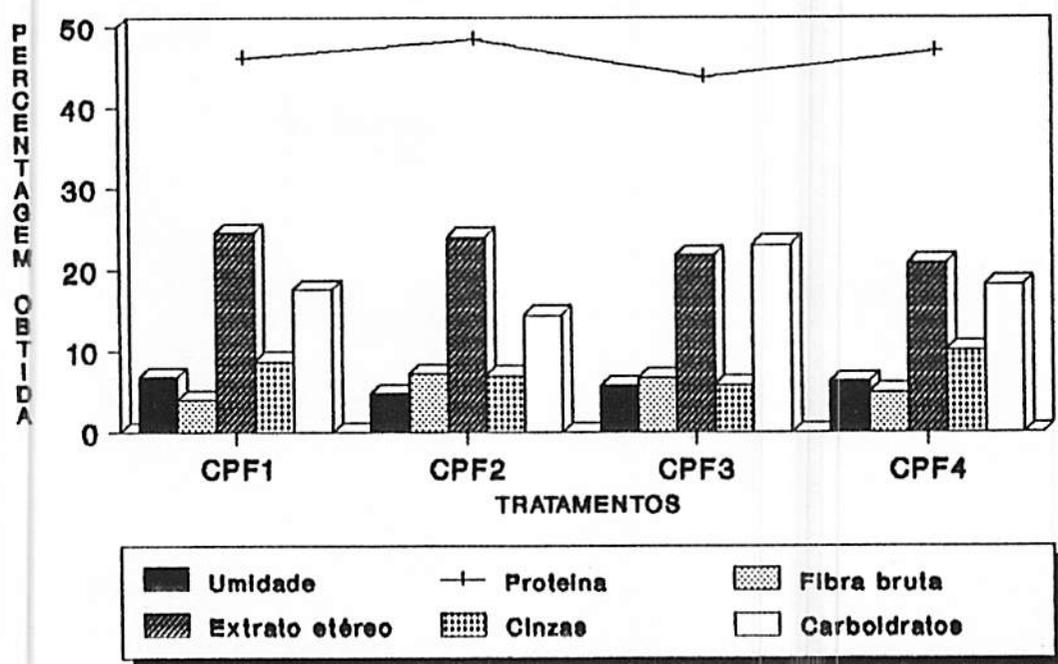


FIGURA 5 - Composição centesimal aproximada nos concentrados proteicos de folhas (CPFS) de cana-de-açúcar. Nov./91. DCA-ESAL, Lavras-MG.

QUADRO 9 - Composição centesimal aproximada nos CPFs de cana de-açúcar. Nov./91. DCA-ESAL, Lavras-MG.

CPF	Componentes (% base seca)					
	PB	FB	EE	Cinzas	CHO	Umidade
1	45,03 ab	4,05 b	24,48 a	8,81 b	17,63 bc	93,16 b
2	47,25 a	7,21 a	23,98 a	6,98 c	14,58 c	95,17 a
3	42,55 b	6,74 a	21,77 b	5,89 c	23,05 a	94,18 ab
4	45,75 a	5,01 b	20,83 b	10,16 a	18,25 b	93,70 b
DMS	2,95	0,98	1,95	1,10	3,65	1,15
CV (%)	2,50	6,54	3,27	6,29	7,63	0,47

Médias seguidas de letra diferente na vertical, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

açúcar (*Saccharum officinarum*) como produto secundário, extremamente fibroso e de material altamente seco, apresentando resultados de 1,36% de N com base na matéria seca e baixo teor de proteína bruta (10%) para o extrato obtido em pH 5,5.

Conseguiu-se uma recuperação de 47,25% da PB no CPF2 quando este foi obtido em pH 6; os valores para CPFs de cana-de-açúcar são compatíveis com os relatados na literatura que

menciona entre 35 a 60% para o CPF de alfafa, uma leguminosa forrageira amplamente utilizada na produção de CPF, inclusive com processos industriais estabelecidos e comercializados (KOHLER & KNUCKLES, 1977). Comparando com outra gramínea forrageira de grande produtividade, o capim Napier, outros pesquisadores encontraram porcentagens de extração entre 25,8 a 52% (CARLSSON et alii, 1984; CHAKRABARTI et alii, 1985; ESPÍNDOLA, 1987). Essas diferenças observadas podem ser atribuídas a vários fatores, entre eles espécies diferentes, a estrutura do tecido foliar (PIRIE, 1971), a adequação da metodologia e equipamentos utilizados.

A análise de variância mostrou diferença significativa ($P < 0,01$) nos teores de proteína entre os CPFs estudados (Quadro 1-Apêndice). Pelo teste de Tukey, em relação ao teor protéico, o CPF3 não difere estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade do CPF1, porém é estatisticamente diferente dos demais (Quadro 9).

Observa-se que o teor de cinzas foi mais elevado no CPF4 (10,18%) obtido no pH natural das folhas. A elevação deste teor deve-se a não lavagem desse produto com água. Os demais CPFs foram lavados com água e assim, o menor teor de cinzas observado foi no CPF3 (5,89%) acompanhado depois pelo CPF2 (6,98%). A análise de variância (Quadro 1-Apêndice) mostrou diferenças significativas nos teores de cinzas ($P < 0,01$) entre os CPFs analisados. O teste de Tukey mostrou diferença significativa entre os teores de cinzas nos CPFs 1, 2 e 4. O teor de cinzas

obtido no CPF2 é estatisticamente igual ao CPF3 (Quadro 10).

PIRIE (1971), considera que os CPFs devem apresentar conteúdos de cinzas inferiores a 3%. Entretanto, para DEEPCHAND (1984), mesmo que folhas apresentem baixo nível protéico e alto teor de cinzas quando comparadas com outras culturas da agricultura convencional, elas contém algum potencial como material para a produção de CPF, especialmente, em sistema integrado para sua completa utilização em alimentos. Além do mais, no caso de cana-de-açúcar, a enorme quantidade de folhas seriam aproveitáveis a cada ano, em um sistema alternativo pelo qual se processariam completamente toda a parte aérea da planta; e a proteína e outros nutrientes, poderão ser produtos secundários adicionais.

A análise de variância (Quadro 1-Apêndice) mostrou diferenças significativas ($P < 0,01$) para os teores de fibra bruta e para os teores de carboidratos entre os CPFs. Pelo Quadro 10 nota-se que os teores de fibra bruta não foram estatisticamente diferentes entre os CPF2 e CPF3 e também entre os CPF4 e CPF1.

Nota-se ainda que o teor de carboidrato do CPF2 não foi estatisticamente diferente do CPF1, porém diferiu estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade dos demais CPFs.

O teor de extrato etéreo observado nos CPFs foi cerca de duas vezes mais elevado que o teor em CPFs de outras espécies de plantas. Observou-se que os frascos que continham o CPF de cana-de-açúcar seco, ficaram oleosos, embora a concentração de

gordura na folha não tenha sido muito elevada quando comparada à comumente encontrada em outras folhas. Isto sugere análise da composição dos lipídeos porque, provavelmente, o CPF poderá servir como fonte de ácidos graxos essenciais e pigmentos. Este dado é importante para a conservação do CPF, uma vez que as folhas apresentam concentrações de ácidos graxos poliinsaturados susceptíveis à oxidação e perda do valor nutritivo. A análise de variância (Quadro 1-Apêndice) mostrou diferenças significativas nos teores de extrato etéreo ($P < 0,01$) entre os CPFs. O teste de Tukey não mostrou diferença significativa nos teores de extrato etéreo entre os CPFs 1 e 2 e também entre os CPFs 3 e 4. O maior teor de extrato etéreo observado foi no CPF1 (24,48%) acompanhado depois pelos CPF2 (23,98%). Observando o teor de matéria seca, não houve diferença significativa entre os CPFs 1, 3 e 4; entretanto, o CPF2 se difere estatisticamente dos demais ao nível de 5% de probabilidade.

A composição centesimal do CPF2, preparado por este método, pode ser discutida nos seguintes aspectos (ver Figura 6):

a) o teor de proteína bruta dos quatro CPFs de cana-de-açúcar analisados indicam uma recuperação das proteínas das folhas num produto com baixo teor de fibras;

b) DEEPCHAND (1984) encontrou em CPF de cana-de-açúcar obtido por processo de termocoagulação valores de 33,9% de proteína bruta e 2,4% de fibra bruta;

c) ABO BAKR et alii (1982) mostraram para o CPF de cana-de-açúcar da mesma variedade, a seguinte composição: proteí-

g
%
BASE
NA
MATERIA
SECA

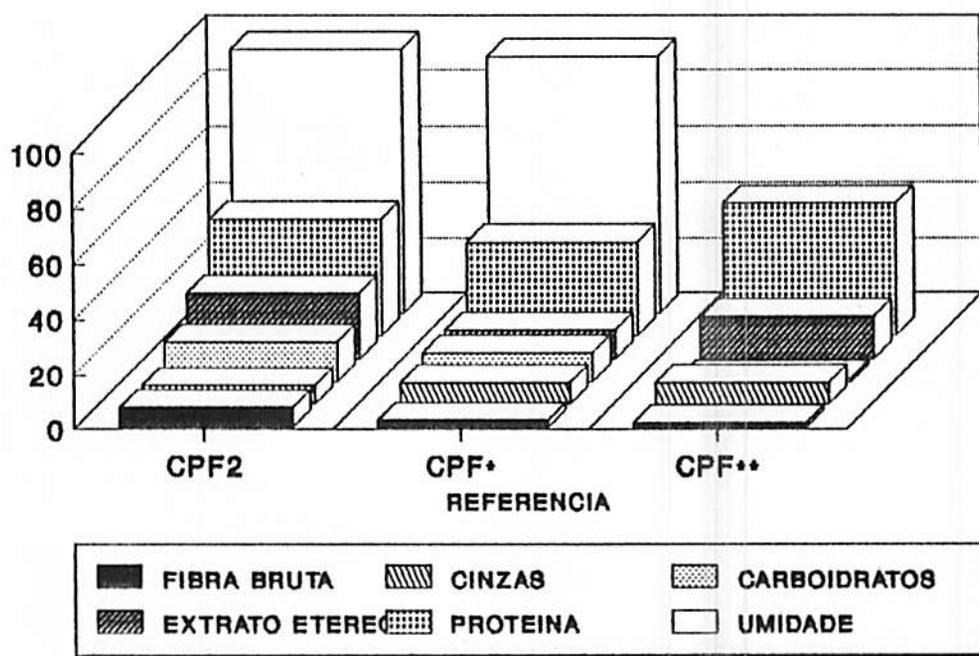


FIGURA 6 - Comparação entre a composição centesimal aproximada em CPFs de cana-de-açúcar com dados da literatura. Nov./91. DCA-ESAL, Lavras-MG. * DEEPCHAND (1984); ** ABO BAKR et alii (1982).

na bruta = 48%; fibra bruta = 1,43%; cinzas = 8,06%; extrato etéreo = 15,5% e carboidratos = 25,9%.

Assim, os valores para os CPFs de cana-de-açúcar são compatíveis com os relatados na literatura e as diferenças observadas devem-se a vários fatores, como já relatados anteriormente.

Verificou-se que o CPF2 contém um elevado teor de nitrogênio protéico (7,5%) apresentando 46,94% de proteína real o que equivale aproximadamente 99% do total da proteína bruta.

Embora o CPF3 tenha apresentado um melhor rendimento de extração, escolheu-se o CPF2 como o ideal para avaliar a qualidade do CPF de cana-de-açúcar por mostrar-se melhor quantitativamente em todos os aspectos estudados.

5.3.1. Conteúdo de elementos minerais nos CPFs

Os teores médios de elementos minerais nos CPFs são apresentados no Quadro 10. Os estudos indicam que a variação do pH influenciou consideravelmente nos teores tanto de alguns minerais micronutrientes como macronutrientes, caracterizando um acúmulo de alguns deles. Os minerais podem estar complexados com as proteínas ou fazer parte da estrutura de alguns aminoácidos, como por exemplo, o enxofre. ESPÍNDOLA (1987) verificou um baixo teor de potássio no CPF de Napier, indicando a possível solubi-

QUADRO 10 - Teores de elementos minerais nos CPFs de cana-de-açúcar. Out./91. BCA-ESAL, Lavras-MG.

Amostra	Macronutrientes (Z)					Micronutrientes (ppm)				
	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Zn	Fe	Mn	B
CPF1	0,154 a	0,267 a	1,473 a	0,185 a	0,270 b	148,7 a	47,4 a	4415,8 a	134,0 A	11,3 a
CPF2	0,125 b	0,178 b	0,900 b	0,119 b	0,278 b	137,2 b	85,8 b	4018,4 a	74,8 b	10,6 a
CPF3	0,144 ab	0,133 c	0,583 c	0,098 c	0,310 a	56,4 d	20,6 d	3843,8 b	189,0 d	9,1 b
CPF4	0,131 b	0,131 c	0,938 b	0,071 d	0,309 a	110,9 c	12,4 c	3265,3 c	41,0 c	6,7 c
CV (Z)	5,86	3,44	10,29	3,66	2,81	0,73	0,68	1,87	2,01	4,06
DMS	0,02	0,02	0,26	0,01	0,02	2,16	1,22	279,44	3,65	0,99

Médias seguidas de letra diferente na vertical, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

lidade desse mineral no sobrenadante final, mostrando a sua importância como biofertilizante. Evidentemente, o potássio também ficou bem reduzido nos CPFs de cana-de-açúcar, indicando que este mineral ficou praticamente solúvel no sobrenadante descartado. Os minerais são requeridos pelos animais em quantidades que dependem da fase de crescimento, das condições fisiológicas (gravidez, lactação) do estado nutricional e da saúde. Os macronutrientes devem estar presentes em maiores quantidades, como por exemplo o cálcio. Entretanto, são também

requeridos os minerais micronutrientes em quantidades muito pequenas, mas de igual importância como é o caso do ferro, cobre, manganês, etc.

O CPF1 de cana-de-açúcar apresentou o melhor teor de cálcio (1,473%) mostrando a importância da utilização desse CPF desde que seja desegmentado, especialmente em crianças nutricionalmente carentes. O enxofre foi reduzido, possivelmente devido ao fato dos CPFs de cana-de-açúcar mostrarem como aminoácido limitante metionina e cistina que contêm enxofre em suas estruturas. A relação enxofre total:nitrogênio é usado como um parâmetro que avalia o potencial nutritivo de proteína de folha (SUBBARAU et alii, 1972). Na investigação da relação de nitrogênio total, enxofre total e dos aminoácidos sulfurosos em CPFs de alfafa e lupino realizada por BYERS (1975) verificou-se que a lavagem do CPF libera o sulfato inorgânico.

Todos os CPFs analisados apresentaram índices mais elevados para cobre e zinco em relação aos limites máximos de tolerância para o ser humano na legislação brasileira (30 e 50 ppm, respectivamente) segundo BICK (1985), exceto o CPF3 que apresentou valores de 20,6 ppm para o zinco. Em geral os índices para os micronutrientes nos CPFs de cana-de-açúcar foram muito elevados; como por exemplo, o índice discrepante de ferro (3265,3 a 4415,8 ppm). Isto pode ser devido a contaminação dos mesmos no próprio processamento de obtenção do CPF, principalmente durante a extração mecânica, onde ocorreu a trituração das folhas em picadeira, processador e liquidificador, expondo estes elementos

em contato com os metais que compõem estes equipamentos.

HORIGOME et alii (1983) estudando o CPF de alfafa coagulado em diferentes pHs, encontraram os seguintes teores de elementos minerais em mg/100 g de matéria seca:

Ca - pH4: 540; pH6: 1,20; pH8: 2,36;

Mg - pH4: 100; pH6: 140; pH8: 250;

K - pH4: 1,06; pH6: 1,15; pH8: 1,20;

P - pH4: 240; pH6: 410; pH8: 1,09.

Estes mesmos autores verificaram que as concentrações de Ca, Mg e P aumentavam com a elevação do pH antes da coagulação, exceto o teor de K. O teor de minerais no CPF depende da capacidade de ligações iônicas das proteínas e da quantidade de sais que são co-precipitados com a proteína do suco verde tanto quanto o resultado do efeito do pH sobre a solubilidade dos sais.

As análises de variância (Quadros 2 e 3-Apêndice) mostraram diferenças significativas ($P < 0,01$) nos teores de todos os elementos minerais entre os CPFs estudados. Pelo teste de Tukey, os teores de Cu, Zn, Mn e Mg diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade entre os CPFs. Entretanto, estatisticamente não houve diferença ($P < 0,05$) nos teores dos de P entre os CPFs 2, 3 e 4; potássio entre os CPFs 3 e 4; enxofre entre os CPFs 1 e 2 e entre os CPFs 3 e 4; ferro entre os CPFs 1 e 2 e boro entre os CPFs 1 e 2.

5.3.2. Teores de amido, açúcares redutores, não redutores e totais nos CPFs

Os valores para amido, açúcares totais, redutores e não redutores são mostrados no Quadro 11. Observa-se que os teores mais elevados de açúcares totais, redutores (maior doçura) e amido, foram encontrados no CPF3. A análise de variância é apresentada no Quadro 4-Apêndice e mostra diferenças significativas nos teores de açúcares redutores, não redutores e totais entre os CPFs estudados ($P < 0,01$). Não houve diferença significativa nos teores de amido entre os CPFs. A presença da concentração de amido, nas folhas, RF e CPFs pode estar relacionada com o fornecimento de energia e compostos intermediários necessários para o desenvolvimento da planta. CHAKRABARTI et alii (1985) estudando CPFs de Napier híbrido encontraram teores de amido de 1,8% para o CPF não fracionado. Pelo teste de Tukey constataram diferenças significativas nos teores de açúcares redutores e totais entre todos os CPFs de cana-de-açúcar. O CPF1 foi o que apresentou menor teor de açúcares redutores (0,120%, em peso úmido).

Observa-se ainda que, a baixa concentração de açúcares em geral, deve-se à solubilidade dos mesmos, ficando a maior parte no sobrenadante descartado. Ainda assim, o baixo teor de açúcares pode contribuir para o sabor doce verificado nos CPFs de cana-de-açúcar.

QUADRO 11 - Valores médios de amido, açúcares não redutores (% em sacarose), redutores (% em glicose) e totais obtidos nos CPFs de cana-de-açúcar. Dez./91. DCA-ESAL, Lavras-MG.

Amostra	Parâmetros			
	Não redutores (% peso úmido)	Redutores (% peso úmido)	Totais (% peso úmido)	Amido (%)
CPF1	0,085 ab	0,120 d	0,205 b	2,520 a
CPF2	0,076 b	0,130 c	0,206 b	2,010 a
CPF3	0,057 c	0,190 a	0,247 a	2,760 a
CPF4	0,095 a	0,140 b	0,241 a	2,140 a
C.V. (%)	5,99	2,07	2,42	9,78
D.M.S.	0,013	0,008	0,014	1,115

Médias seguidas de letra diferente na vertical, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5.3.3. Carotenóides totais

Na Figura 7 apresenta-se o conteúdo de carotenóides totais. Pode-se observar que os CPFs retém praticamente a mesma

quantidade de carotenos das folhas.

Segundo DE FREMERY et alii (1972) e ARKOLL & HOLDEN (1973) os carotenos apresentam maior estabilidade em pH alcalinos que em meios ácidos, o que não foi verificado neste trabalho.

A análise de variância (Quadro 4-Apêndice) não mostrou diferenças significantes ($P < 0,01$) nos teores de carotenóides entre os CPFs de cana-de-açúcar. O teste Tukey também não mostrou diferenças significativas entre os teores de carotenóides nos CPFs.

Os lipídeos peroxidáveis (linoléico e linolênico) em presença de oxigênio molecular e de um catalisador como a lipoxigenase presente na folha, promovem produtos de oxidação que, por sua vez, podem formar radicais livres e peróxidos que reagem com sistemas insaturados como no caso dos carotenos, provocando o rompimento da molécula (DOUILLARD, 1985). Estas reações de oxidação dos lipídeos insaturados são favorecidas em meio ácido (DE FREMERY et alii, 1972). No entanto, não foi observado perdas devidas à degradação oxidativa durante o processamento para a obtenção de CPFs no presente trabalho.

Estes resultados são relevantes para as diversas aplicações nutricionais do CPF, uma vez que estes pigmentos além de serem convertidos em vitamina A nos animais, podem contribuir para a pigmentação de ovos e da pele de aves.

ARKOLL & HOLDEN (1973) verificaram que a perda de carotenóides durante a maceração das folhas deve-se, principalmente, à ação enzimática podendo ser minimizada com a

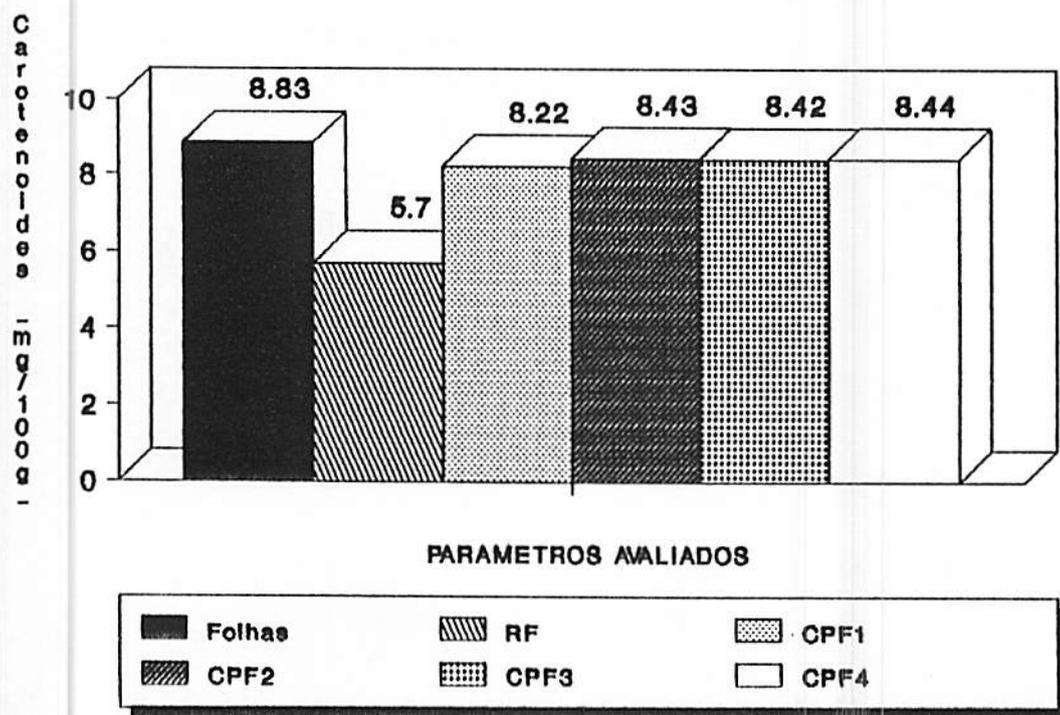


FIGURA 7 - Valores médios de carotenóides totais obtidos das folhas, RF e CPFs de cana-de-açúcar.

adição de alcali e rapidez no processamento, encontrando para CPF de alfafa teores para carotenóides de 1,26 a 1,31 mg/g de matéria seca. Segundo estes mesmos autores, duas a três gramas de um CPF bem preparado, ingeridos diariamente, podem suprir o suficiente de β -caroteno ao requerimento apropriado de vitamina A para humanos.

5.3.4. Compostos fenólicos - Taninos

Entre os polifenóis mais importantes em relação aos vegetais, encontram-se os taninos condensados, que são compostos fenólicos com peso molecular entre 500 e 3000 e que possuem alta capacidade de precipitar proteínas.

Segundo GOLDSTEIN & SWAIN (1963), a adstringência é atribuída às frações menos polimerizadas de compostos fenólicos, ou frações mono e di-oligoméricas extraíveis respectivamente em metanol e metanol 50%. As formas polimerizadas, extraíveis em água não têm característica adstringente. Estes mesmos autores, denominam o somatório das frações extraíveis em metanol e metanol 50% como fenólicos ativos e conferem aos mesmos a característica do gosto adstringente acentuado em alimentos de origem vegetal. Os efeitos deletérios dos taninos dependem da quantidade, tipo e da sua capacidade de precipitar com proteínas.

Os resultados obtidos estão expressos no Quadro 12 e

Quadro 5-Apêndice.

O Quadro 12 mostra que o CPF3 apresentou maior presença de fenólicos ativos (829,4 mg/100 g) e o CPF2 apresentou um baixo teor de fenólicos ativos e, conseqüentemente, a menor adstringência verificada. A análise de variância (Quadro 5-Apêndice) mostrou diferenças significativas nos teores de fenólicos na forma mono-oligomérica ($P < 0,05$) entre os CPFs e, nas formas di-oligoméricas não houve diferença significativa. Pelo teste de Tukey constata-se diferenças significativas entre os teores de taninos na forma di-oligomérica (extraídos em metanol 50%) entre o CPF1 e CPF3. Não houve diferença significativa nos teores de taninos na forma mono-oligomérica (extraídos em metanol) entre o CPF1 e CPF2 e também entre o CPF3 e CPF4.

Para as formas poliméricas dos compostos fenólicos extraíveis em água, observou-se que o CPF3, coagulado sob condições ácidas, apresentou o maior teor desses compostos. A análise de variância (Quadro 5-Apêndice) não mostrou diferenças significativas nos teores de taninos nas formas polimerizadas entre os CPFs. Pelo teste de Tukey também não houve diferenças significativas nos teores de taninos poliméricos entre os CPFs. Em resumo, os CPFS de cana-de-açúcar apresentaram teores mais elevados de fenólicos ativos e menores teores de fenólicos polimerizados.

Observa-se ainda pelo Quadro 12 que o CPF3 apresentou maior teor de fenólicos totais, sendo que o CPF2 foi o mais

QUADRO 12 - Teores percentuais de taninos e compostos fenólicos totais dos CPFs de cana-de-açúcar. Nov./91. DCA-ESAL, Lavras-MG.

	Teor de fenólicos (mg/100 g)			Fenólicos ^a ativos	Fenólicos ^b totais
	Metanol	Metanol (50%)	Água		
CPF1	314,6 b	471,9 a	286,0 a	786,5 ab	1072,5 a
CPF2	271,7 b	443,3 ab	257,4 a	715,0 b	972,4 a
CPF3	443,3 a	386,1 b	328,9 a	829,4 a	1158,3 a
CPF4	328,9 a	443,3 ab	314,6 a	772,2 ab	1086,8 a
C.V. (%)	7,88	4,64	10,22	2,91	4,42
D.M.S.	108,96	82,37	123,55	92,09	193,16

Médias seguidas de letra diferente na vertical, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

^a Metanol + Metanol (50%).

^b Metanol + Metanol (50%) + água.

baixo. A presença de fenólicos totais no CPF3 se deve, principalmente, pela maior presença das formas mono-oligoméricas e nos demais CPFs, pela maior presença das formas di-oligoméricas. Entretanto, estatisticamente, essas diferenças não são significativas nos teores de fenólicos totais entre os CPFs indicando que a variação do pH antes da coagulação não afetou na

quantidade dos mesmos.

Atualmente os métodos de precipitação de proteínas foliares vêm sendo desenvolvidos para removerem ou diminuir os altos níveis de polifenóis. Nas diversas pesquisas, o interesse está voltado para as implicações que estes compostos podem causar na digestibilidade de alimento de origem vegetal, principalmente os foliares (BUTLER, 1982; BARRY & MANLEY, 1986; HUANG et alii, 1986; SRIPAD & NARASINGA RAO, 1987; MUELLER-HARVEY et alii, 1987; DAWRA et alii, 1988 e MAKKAR et alii, 1988).

Os CPFs de cana-de-açúcar apresentaram teores de polifenóis dentro dos limites de tolerância (inferiores a 1,0%), podendo não interferir no aproveitamento destas fontes protéicas e serem considerados não prejudiciais à saúde (SUBBA RAU et alii, 1972).

Outros estudos serão necessários para o CPF de cana-de-açúcar, como por exemplo, a presença de inibidores de proteases (tripsina e quimiotripsina), a fim de verificar a presença de outros fatores fisiológicos que prejudicam a sua digestibilidade.

5.4. Avaliação da qualidade protéica do CPF de cana-de-açúcar

5.4.1. Composição de aminoácidos

Os aminoácidos essenciais presentes na fração protéica

de uma determinada proteína, caracteriza mas não descreve o valor biológico da mesma (SGARBIERI, 1987). A composição de aminoácidos de proteínas foliares é bastante uniforme, podendo ser comparada favoravelmente com a proteína animal e todas as folhas podem ser consideradas fontes com potencial para a produção de CPFs comestíveis.

O Quadro 13 apresenta as concentrações de aminoácidos presentes nos CPFs de cana-de-açúcar. Esta tabela mostra que todos os aminoácidos essenciais estão presentes. O pH do suco verde influenciou os teores de todos os aminoácidos nos CPFs. BYERS (1971) verificou que os CPFs, geralmente, apresentam composição em aminoácidos muito semelhantes. Constatou ainda que, se existem diferenças, elas estão nas concentrações de aminoácidos sulfurados e prolina. A composição de aminoácidos analisados mostra que o ácido glutâmico apresentou teores mais elevados em todos os CPFs, passando a ser o aminoácido predominante; seguido pela asparagina que também apresentou teores elevados.

Comparando os aminoácidos essenciais com o padrão teórico da FNB (1980), observa-se que: o CPF1 mostrou-se deficiente em isoleucina, lisina, aminoácido sulfurados e valina; o CPF2 mostrou-se deficiente apenas nos aminoácidos sulfurados; o CPF3 é deficiente em aminoácidos sulfurados e lisina e o CPF4 é deficiente em isoleucina, lisina, aminoácidos sulfurados e valina. Pode-se dizer que, embora todos os CPFs de cana-de-açúcar mostrassem deficiência nos aminoácidos sulfurados, a variação do

QUADRO 13 - Composição em aminoácidos dos CPFs de cana-de-açúcar em comparação com a proteína de referência. Dez./91. DCA-ESAL, Lavras-MG.

Aminoácido ^{b,c}	CPF ^a				Proteína de referência ^d
	1	2	3	4	
Isoleucina	3,34 L	4,71	4,20	3,44 L	4,2
Leucina	8,46	10,05	8,50	7,94	7,0
Lisina	4,10 L	5,46	5,06 L	3,95 L	5,1
Metionina	1,88	2,04	1,85	1,75	
Cistina	0,12	0,22	0,57	0,16	
Metionina + Cistina	2,00 L	2,26 L	2,42 L	1,91 L	2,6
Fenilalanina	4,77	6,03	5,32	4,90	
Tirosina	2,80	4,09	3,37	3,55	
Fenilalanina + Tirosina	7,57	10,12	8,69	8,45	7,3
Treonina	4,11	4,74	4,33	4,94	3,5
Triptofano	1,65	1,10	1,15	1,12	1,1
Valina	4,13	5,86	5,21	4,28	4,8
Glicina	5,06	5,58	5,13	4,87	-
Prolina	4,65	4,76	4,43	4,06	-
Alanina	6,08	6,59	6,21	5,70	-
Ác. glutâmico	10,03	10,79	10,49	9,18	-
Histidina	1,59	1,95	1,97	1,71	-
Serina	4,36	4,93	4,52	4,04	-
Arginina	5,03	6,37	5,35	4,62	-
Ác. Aspártico	8,07	9,28	8,49	7,26	-
	4 lim.	1 lim.	2 lim.	4 lim.	

^a MS desengordurada

^b expresso em g/100 g proteína

^c média de duas determinações

^d FOOD NUTRITION BOARD, 1980.

L amino ácido limitante.

a variação do pH no suco verde antes da coagulação pode interferir nos teores dos aminoácidos essenciais e que, sob condições pouco ácidas, não ocorrem perdas consideráveis dos aminoácidos essenciais.

HORIGONE et alii (1983) encontraram teores mais elevados para todos os aminoácidos dos CPFs de alfafa, obtidos com a variação do pH do suco verde antes da coagulação. Verificaram que esses CPFs não mostraram deficiência nos aminoácidos essenciais e que não houve diferenças significativas entre as proteínas foliares coaguladas em pH's diferentes.

Foram analisadas as limitações da proteína dos CPFs de cana-de-açúcar através do escore de aminoácidos em relação ao padrão da FAO\WHO (1973).

O escore químico relaciona a quantidade total de nitrogênio protéico que possa promover a síntese celular (SGARBIERI, 1987). Uma análise das limitações da proteína dos CPFs de cana-de-açúcar demonstra que os aminoácidos limitantes primário e secundário apresentam variações em relação ao padrão utilizado. As folhas apresentaram teores pouco maiores em aminoácidos sulfurados e em lisina e estes mostraram-se limitantes. Evidentemente, os aminoácidos sulfurados e a lisina, foram limitantes primário e secundário, respectivamente, em todos os CPFs.

Na Figura 8 observa-se a comparação entre o escore de aminoácidos do CPF de cana-de-açúcar e os de proteínas de diferentes origens, incluindo a recomendação da FAO/WHO (1973).

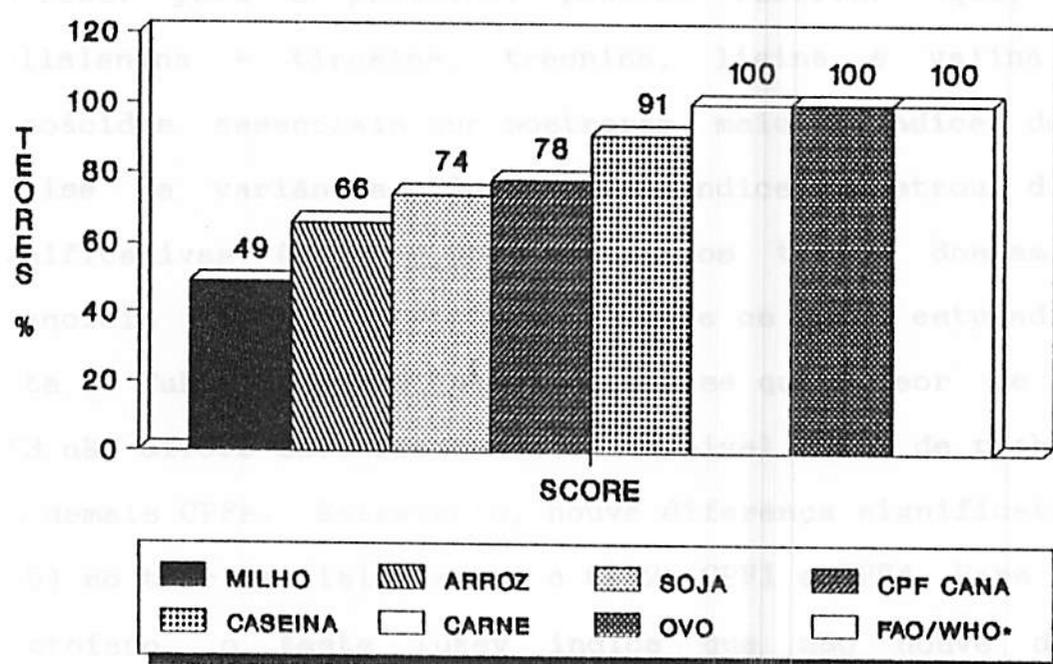


FIGURA 8 - Comparação entre o escore de aminoácidos do CPF de cana-de-açúcar e os de alimentos comuns (Bickoff et alii, 1975). FAO/WHO (1973).

Esta comparação revela que o CPF de cana-de-açúcar tem escore químico equivalente ao da soja e que milho e arroz apresentam escore químico inferior.

Segundo PELLETT & YOUNG (1980), a razão de A/E é a relação entre o teor do aminoácido essencial individual na proteína dietética e o teor total de aminoácidos essenciais (expressados em mg de aminoácido individual por g de aminoácidos totais). Sendo a relação A/E o valor que cada aminoácido contribui para a proteína, pode-se observar que, leucina, fenilalanina + tirosina, treonina, lisina e valina são os aminoácidos essenciais que mostraram maiores índices de A/E. A análise de variância (Quadro 6-Apêndice) mostrou diferenças significativas ($P < 0,05$) apenas nos teores dos aminoácidos essenciais lisina e triptofano entre os CPFs estudados. Pelo teste de Tukey (Quadro 14), constata-se que o teor de lisina do CPF3 não difere estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade dos demais CPFs. Entretanto, houve diferença significativa ($P < 0,05$) no teor de lisina entre o CPF2, CPF1 e CPF4. Para o teor de triptofano, o teste Tukey indica que não houve diferenças significativas entre os CPFs 2, 3 e 4; porém, o CPF1 difere significativamente ($P < 0,05$) dos demais CPFs.

Apesar da baixa concentração dos aminoácidos sulfurados e da lisina nos CPFs de cana-de-açúcar, nada impede a possibilidade de serem incorporados em formulação de alimentos como suprimento protéico. Segundo GALOPPINI & FIORENTINI (1985), o nível ótimo de CPF purificado para ser usado em produtos ali-

QUADRO 14 - Teores médios de aminoácidos essenciais e relação A/E obtidos nos CPFs de cana-de-açúcar. Dez./91. DCA-ESAL, Lavras-MG.

CPF	Aminoácido (g/100 g proteína)							
	Val.	A/E	Isol.	A/E	Leu.	A/E	Lis.	A/E
1	4,13 a	116,8	3,34 a	94,5	9,46 a	239,2	4,10 b	115,9
2	5,86 a	132,3	4,71 a	106,3	10,05 a	226,9	5,46 a	123,2
3	5,21 a	131,7	4,20 a	106,2	8,50 a	214,9	5,06 ab	127,9
4	4,28 a	118,7	3,44 a	95,4	7,94 a	220,3	3,95 b	109,6
C.V.(%)	13,11		10,62		6,51		6,20	
D.M.S.	2,60		1,70		2,32		1,17	

CPF	Aminoácido (g/100 g proteína)							
	Tri.	A/E	Tre.	A/E	Met.+Cis.	A/E	Fen.+Tir.	A/E
1	1,65 a	46,7	4,11 a	116,2	2,50 a	56,6	7,60 a	214,1
2	1,08 b	24,8	4,74 a	107,0	2,26 a	51,0	10,12 a	228,4
3	1,15 b	29,1	4,33 a	109,4	2,42 a	61,2	8,69 a	219,7
4	1,11 b	31,1	4,94 a	137,3	1,91 a	53,0	8,45 a	234,5
CV(%)	6,99		6,43		18,01		9,09	
D.M.S.	0,36		1,12		1,67		3,24	

Médias seguidas de letra diferente na vertical, diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Relação entre o teor do aminoácido essencial individual na proteína dietética e o teor total de aminoácidos essenciais.

$$A/E = \frac{\text{mg do aa essencial}}{\text{g total de aas essenciais}}$$

mentícios é de 5 a 10%. BUCHANAN (1969) observou que durante o aquecimento a lisina é muito mais afetada que os aminoácidos sulfurados, o que pode levar a uma condição em que a lisina seja o aminoácido limitante no CPF de cana-de-açúcar. Como a precipitação e a secagem do material protéico na preparação de CPFs envolvem calor, pode-se atribuir a estas operações o baixo teor de lisina observado neste trabalho.

Alguns autores como BETSCHART & KINSELLA (1973) sugeriram trabalhar com pH próximo de 8 para reduzir a atividade proteolítica, estabilizar carotenos e xantofilas e aumentar a consistência do coágulo. Entretanto, o CPF1 obtido em pH 8 apresentou o menor teor de lisina devido à permanência sob condição alcalina do suco verde inicial, o que pode ter favorecido a ocorrência da reação de Maillard, fato que também pode ser responsabilizado pelo baixo teor de lisina. A reação de Maillard envolve primeiramente, uma reação de condensação entre o α -aminogruppo de um aminoácido ou proteínas e os grupos carbonilas dos açúcares redutores produzindo uma glicosilamina N-substituída. Além da lisina, que contribui com a maioria dos grupos amino livres da proteína na forma de ϵ -aminogruppos, outros aminoácidos com grupos amino adicionais podem também participar da reação, como arginina, triptofano e histidina.

O nível protéico e a composição de aminoácidos não são suficientes para descrever o valor nutricional do CPF sendo necessário relatar a digestibilidade como índice biológico.

A avaliação da qualidade de uma proteína vegetal

através do escore químico, fornece resultados diferentes daqueles dos ensaios biológicos devido basicamente a uma redução da digestibilidade atribuída à biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais.

5.4.2. Composição das dietas

Pode-se verificar através do Quadro 15 que os resultados da composição das dietas semi-sintéticas estão de acordo com o que se esperava a partir de seu preparo. As pequenas variações são devidas ao efeito técnico operacional durante sua formulação.

QUADRO 15 - Composição centesimal aproximada das dietas oferecidas aos animais no ensaio biológico. Dez./91. DCA-ESAL, Lavras-MG.

Dietas	Unidade (%)	Proteína bruta (%)	Extrato etéreo (%)	Cinza (%)	Carboidratos ^a (%)	Fibra bruta (%)
Caseína	7,3 ± 0,2	9,1 ± 0,2	7,9 ± 0,3	1,28 ± 0,4	73,84 ± 0,5	0,58 ± 0,3
CPF	6,9 ± 0,5	9,2 ± 0,2	8,5 ± 0,2	1,93 ± 0,4	72,51 ± 0,4	0,96 ± 0,2
Aprotéica	8,2 ± 0,4	-	8,3 ± 0,4	0,79 ± 0,3	82,00 ± 0,5	0,71 ± 0,4

^a Calculado por diferença

^b N x 6,25

^c Média de três determinações.

5.5. Avaliação biológica do CPF

Os métodos biológicos são preferidos para a determinação da qualidade da proteína, pois estes determinam a biodisponibilidade dos nutrientes essenciais de um alimento e afetam diretamente os índices indicativos do valor nutritivo. Segundo PIRIE (1978) o valor nutritivo das proteínas de folhas é, provavelmente, mais limitado pela sua digestibilidade do que pela sua composição em aminoácidos.

Dentre os CPFs obtidos, o CPF2 mostrou-se quantitativamente melhor em todos os aspectos estudados, principalmente no que diz respeito ao seu perfil de aminoácidos. Assim, por questões econômicas, foi o único utilizado para avaliar a qualidade da proteína do CPF de cana-de-açúcar.

EFICIÊNCIA ALIMENTAR

Os resultados do estudo do CEA estão demonstrados no Quadro 16 e pelos dados, pode-se observar que os valores de CEA para o grupo controle de caseína foram muito superiores ao grupo de animais mantidos com dieta de CPF de cana-de-açúcar.

A análise de variância mostrou diferença significativa ($P < 0,01$) nos valores de CEA observados no grupo de animais alimentados com a dieta controle de caseína e nos alimentados com dieta à base de CPF de cana-de-açúcar (Quadro 16).

As correlações entre CEA:RPL (coeficiente de correlação

= 0,9895), CEA:UPL (coeficiente de correlação = 0,9437), CEA:Da (coeficiente de correlação = 0,9417) e CEA:D "in vitro" (coeficiente de correlação = 0,9448) são altamente significativas ao nível de 1% de probabilidade.

5.5.1. Índices de crescimento

Os métodos mais usados baseados no crescimento de animais (CEP e RPL) podem ser verificados no Quadro 16.

Os resultados analisados no Quadro 16 sugerem que os índices obtidos para os ratos alimentados com a dieta experimental apresentaram crescimento quando comparado com os resultados obtidos por pesquisadores que utilizaram CPFs de outras plantas; conforme o que será pronunciado a seguir:

A) COEFICIENTE DE EFICÁCIA PROTÉICA

Os resultados do CEP são apresentados no Quadro 16 e os valores para caseína e para o CPF foram 2,54 e 1,46, respectivamente. Verifica-se pela análise de variância, uma diferença significativa ($P < 0,01$) nos valores de CEP observados (Quadro 7-Apêndice). Pelo teste de Tukey, o CEP nos animais mantidos com dieta Caseína (padrão) difere estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade do CEP dos animais alimentados com dieta à base de CPF (Quadro 16).

QUADRO 16 - Médias e desvios padrões da eficiência alimentar (CEA), coeficiente de eficácia protéica (CEP) e razão protéica líquida da proteína (RPL) dos animais alimentados com dieta à base de CPF de cana-de-açúcar e caseína "ad libitum". Dez./91. DCA-ESAL, Lavras-MG.

Grupos	Peso (g) Inicial	Ganho de peso (g)	Consumo de dieta (g)	Consumo de proteína (Z)	CEP ^b	CEA ^b	RPL ^c
Caseína	32,62	89,12	384,40	34,97 a	2,54 a	0,23 a	4,45 a
	± 2,20	± 10,40	± 21,60	± 1,96	± 0,18	± 0,02	± 0,32
CPF2	32,12	35,87	268,14 b	24,59	1,46 b	0,13 b	2,88 b
	± 2,17	± 4,49	± 31,18	± 2,77	± 0,22	± 0,02	± 0,37
Aprotéico ^a	32,50	- 8,12	66,92 c	-	-	-	-
	± 2,00	± 1,03	± 9,64	-	-	-	-
DMS			36,87	2,28	0,30	0,03	0,51
CV (%)			9,42	4,65	10,15	10,29	9,41

Médias seguidas de letra diferente na vertical, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

^a duração 10 dias

^b duração 28 dias

^c duração 14 dias.

O CEP está diretamente mais relacionado com RPL (coeficiente de correlação = 0,9880, significativo ao nível de 1% de probabilidade) e D "in vitro" (coeficiente de correlação =

0,9509, significativo ao nível de 1% de probabilidade) do que com UPL (coeficiente de correlação = 0,9377, significativo a 1% de probabilidade) e Da (coeficiente de correlação = 0,9455, significativo a 1% de probabilidade). Os valores obtidos neste estudo foram semelhantes aos descritos na literatura para CPFs do Napier e da alfafa. HORIZOME et alii (1983) estudando amostras de alfafa verificaram que estatisticamente não houve diferenças no crescimento de ratos alimentados com CPFs coagulados em diferentes pH's e encontraram valores de CEP mais elevados (3,78 a 3,83) para o CPF de alfafa. Segundo OSTROWSKI-MEISSNER (1980), o crescimento dos ratos aumenta quando a dieta contendo CPF de pastagem é suplementada com metionina, lisina e triptofano verificando um aumento de 1,4 a 2,7 para o CEP do grupo experimental e 2,8 para o CEP do grupo controle caseína. CARLSSON et alii (1984) obtiveram valores de CEP 1,50 e 2,50 para o CPF de Napier e caseína, respectivamente. HUMPHRIES (1982) menciona que em provas de alimentos com animais utilizando CPFs, estes podem ser favoravelmente comparados com outros alimentos e podem ser excelentes suplementos para outras fontes protéicas proporcionando faixas de CEP de 1,1 a 2,3 para concentrados não fracionados.

O resultado de CEP para CPF de cana-de-açúcar parece ser razoável e presunõe que o abaixamento da qualidade nutricional pode ser devido ao elevado teor de cinzas.

As variações encontradas na literatura para valores de CEP, podem ser explicadas pela influência de fatores intrínsecos,



tais como: idade, espécie e variedade das plantas e origem celular das proteínas; e fatores extrínsecos, entre os quais figuram os tratamentos tecnológicos, métodos de secagem e outros.

A Figura 9 ilustra as curvas ajustadas para o ganho de peso médio em gramas dos ratos, em função de avaliações semanais, do grupo alimentado com a dieta controle e do grupo alimentado com a dieta experimental. Observa-se que na primeira semana o crescimento dos animais alimentados com dieta à base de CPF praticamente não modificou. O crescimento desses animais foi mais visível a partir da segunda semana, devido a uma adaptação dos mesmos ao consumo deste produto. Verificou-se uma correlação positiva entre o valor de CEP para o CPF de cana-de-açúcar e o ganho de peso (coeficiente de correlação $r = 0,99$ para $n = 8$, na regressão linear analisada).

Sabe-se que o ganho de peso, isoladamente, não é considerado um indicador da qualidade de uma proteína, embora seus resultados sejam refletidos no CEP e no CEA; do mesmo modo que o consumo de ração e de proteína. Um dos fatores que levam a isso, é que o ganho de peso pode estar relacionado à retenção de água e produção de lipídeos no organismo, devido a composição do alimento ingerido.

B) RAZÃO PROTEICA LÍQUIDA

Os valores obtidos para o RPL aos 14 dias de experimento são mostrados no Quadro 16. Ainda que o período experimental tenha sido somente metade do experimento de CEP,

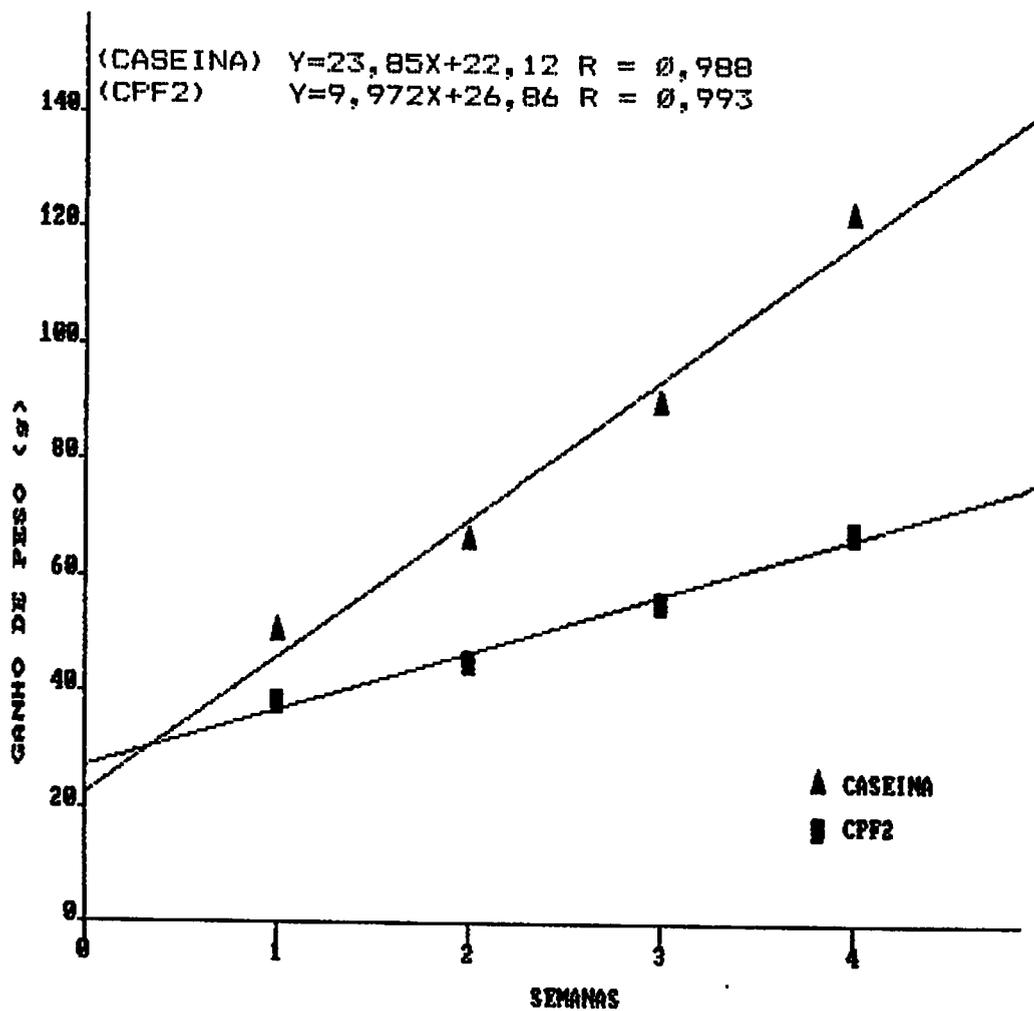


FIGURA 9 - Crescimento médio dos ratos utilizados no ensaio biológico de CEP do CPF e do grupo controle alimentados à base de caseína. Dez.91. ESAL, Lavras-MG.

comparando-se, portanto, a proporcionalidade do valores de RPL e dos valores de CEP, verifica-se que os valores de RPL foram superiores aos valores de CEP.

O CEP requer um tempo maior de experimento e, como os animais têm diferentes requerimentos de aminoácidos nas etapas de desenvolvimento, a desvantagem do RPL é subestimar ou superestimar as proteínas que sejam deficientes em aminoácidos específicos.

CARLSSON & HANCZAKOWSKI (1984), estudando a qualidade nutricional, encontraram RPL igual a 2,42 e 4,76 para o CPF de Napier e caseína, respectivamente. Os mesmos autores verificaram um aumento nos valores RPL do CPF de Napier (3,04%) quando esta dieta foi suplementada com metionina e lisina. Os resultados obtidos para o RPL do CPF de cana-de-açúcar foram similares aos de CARLSSON et alii (1984).

Os índices obtidos para o CPF de cana-de-açúcar, podem estar relacionados às limitações determinadas pelos aminoácidos essenciais (lisina e aminoácidos sulfurados, verificadas através das análises químicas e do cálculo químico); pela reação de Maillard, que torna biologicamente indisponível alguns dos aminoácidos essenciais; assim como também pela presença de elevados teores de cinzas e fibras que podem ter influenciado na digestibilidade, uma vez que os índices obtidos de compostos fenólicos nos CPFs foram inferiores a 1,0% e dentro do limite de tolerância para humanos (SUBBA RAU & RAMANA, 1972).

A análise de variância mostrou diferença significativa

($P < 0,01$) nos RPL observados entre os animais alimentados com dieta caseína (padrão) e dieta CPF. Pelo teste de Tukey, o RPL do grupo caseína (controle) difere estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade do grupo teste (Quadro 8-Apêndice).

O RPL está diretamente mais relacionado com a D "in vitro" (coeficiente de correlação = 0,9320, significativo ao nível de 1% de probabilidade) embora as correlações entre RPL:UPL (coeficiente de correlação = 0,9285) e RPL:Da (coeficiente de correlação = 0,9276) também sejam altamente significativas ao nível de 1% de probabilidade.

5.5.2. Utilização protéica líquida verdadeira

Foi determinado por ensaios de retenção de nitrogênio em que se utilizam dados de determinação de nitrogênio total da carcaça do grupo mantido na dieta contendo a proteína teste ou controle e no grupo em dieta aprotéica. Este índice mede a porcentagem do nitrogênio ingerido que é retido no organismo. Verificando os resultados obtidos na análise da carcaça dos animais no Quadro 17, observa-se que o grupo controle de caseína apresentou valor superior para o teor de lipídeo em relação aos demais grupos estudados.

O UPL do CPF de cana-de-açúcar foi relativamente alto, principalmente devido às poucas limitações de aminoácidos essen-

QUADRO 17 - Valores médios e desvio padrão em função da análise das carcaças dos animais alimentados com dieta à base de CPF de cana-de-açúcar e dieta controle de caseína. Dez./91. DCA-ESAL, Lavras-MG.

Grupos	Carcaça						Dieta	Z N dieta	UPL
	Integral (g)	Seca (g)	Unidade (%)	Lipídeo (%)	N (%)	N total (g)	ingerida (g)	ingerida	
Caseína	76,98	49,59	64,54	13,86	6,69	3,32	171,32	2,49	88,10 a
	± 5,26	± 3,23	± 4,27	± 0,72	± 0,47	± 0,31	± 11,42	± 0,16	± 3,55
Concentrado protéico	41,04	25,10	61,07	8,74	8,89	2,23	124,68	1,83	60,79 b
	± 4,42	± 3,08	± 1,35	± 0,49	± 0,29	± 0,24	± 14,86	± 0,26	± 13,39
Aprotéico	26,48	15,44	58,23	2,45	7,28	1,12	69,62	-	-
	± 2,27	± 1,68	± 1,49	± 0,11	± 0,56	± 0,15	± 9,77	-	-
DMS									7,51
CV (%)									8,34

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

† duração 10 dias.

ciais do CPF2, levando a uma maior retenção de nitrogênio ingerido.

CARLSSON & HANCZAKOWSKI (1985) obtiveram para o CPF de alfafa, UPL igual a 54%, verificando que o UPL da mistura CPF de alfafa + farinha de peixe foi inferior (48%). Estes mesmos

autores sugerem que o CPF branco de alfafa é melhor utilizado quando suplementado com dietas baseadas em cereal ou leite. Entretanto, SINGH (1984) constatou um UPL de 78,87% para caseína e 63,28% para o CPF de alfafa não fracionado obtido por termocoagulação. Os dados obtidos para CPF de cana-de-açúcar são similares aos encontrados na literatura para CPFs obtidos nas mesmas circunstâncias.

A análise de variância (Quadro 8-Apêndice) mostrou diferenças significativas nos valores de UPL ($P < 0,01$) entre os animais do grupo caseína (padrão) e grupo CPF. O teste Tukey (Quadro 17) também mostrou diferença significativa entre esses grupos.

As correlações entre UPL x Da e UPL x D "in vitro" são significativas ao nível de 1% de probabilidade, mostrando coeficientes de correlação igual a 0,8882 e 0,8866, respectivamente.

Com os índices biológicos estudados nesse experimento, pode-se concluir que o CPF de cana-de-açúcar pode ser utilizado como fonte protéica para nutrição humana, desde que suplementado com outra proteína rica em aminoácidos sulfurados e lisina e que seja obtido por métodos que possam eliminar compostos indesejáveis que possam prejudicar o seu aproveitamento.

5.5.3. Digestibilidade "in vitro" e "in vivo" do CPF de cana-de-açúcar

No Quadro 18 compara-se o valor obtido na determinação da digestibilidade in vitro para o CPF2 e caseína e digestibilidade in vivo obtida no ensaio biológico.

QUADRO 18 - Médias e desvios padrões da digestibilidade in vitro, digestibilidade aparente (Da) e digestibilidade verdadeira da proteína (Dv) dos animais alimentados com dietas à base de CPF de cana-de-açúcar e caseína. Dez./91. DCA-ESAL, Lavras-MG.

Grupos	Nitrogênio (g)			Digestibilidade	Da*	Dv*
	Ingerido	Excretado	Absorvido	"in vitro" (%)	(%)	(%)
Caseína	5,60	0,42	5,17	96,76 a	92,45 a	94,06 a
	± 0,31	± 0,03	± 0,30	± 2,50	± 0,61	± 0,62
Concentrado protéico	3,82	1,85	1,97	54,30 b	51,61 b	53,97 b
	± 0,24	± 0,11	± 0,14	± 1,47	± 0,87	± 0,83
Aprotéico	-	0,09	-	-	-	-
	-	± 0,01	-	-	-	-
DMS				3,30	0,87	0,94
CV (%)				3,49	0,98	1,02

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

* Duração 14 dias.

A análise de variância mostrou diferenças altamente significativas ($P < 0,01$) nos valores de D_a , D_v e D "in vitro" observados no grupo de animais mantidos com a dieta caseína (padrão) e o mantido com dieta à base de CPF de cana-de-açúcar (Quadro 18).

As correlações entre $D_a:D_v$ (coeficiente de correlação = 0,9999), $D_a \times D$ "in vitro" (coeficiente de correlação = 0,9910) e $D_v \times D$ "in vitro" (coeficiente de correlação = 0,9904) são altamente significativas ao nível de 1% de probabilidade (Quadro 9-Apêndice).

A digestibilidade in vitro encontrada para o CPF de cana-de-açúcar e caseína foi 54,30% e 96,53%, respectivamente. O CPF de cana-de-açúcar demonstrou um balanço de aminoácidos favorável, entretanto as medidas dos valores nutritivos protéicos resultam em valores inferiores do que se esperava do modelo de aminoácidos. Isto pode ser devido à perda do valor nutritivo durante o processo de secagem e perdas da disponibilidade de aminoácidos devido à presença de lipídeos auto-oxidativos polinsaturados.

Segundo vários autores, a digestibilidade in vitro de CPFs tem sido relatada na faixa de 65 a 85% (SAUNDERS et alii, 1973; OSTROWSKI-MEISSNER, 1980; McINTOSH & MANSELL, 1983). A digestibilidade do CPF de cana-de-açúcar pode também ter sido afetada por componentes menores tais como: lipídeos e fibras. LEXANDER et alii (1970) citam que a presença de resíduos de organelas no CPF pode diminuir o ataque enzimático. Este problema

também pode estar ocorrendo com o CPF2, visto possuir o índice baixo de polifenóis.

Em relação à digestibilidade *in vitro* do CPF de cana-de-açúcar (54,30%) é considerada relativamente boa quando comparada à de outros CPFs e pode-se concluir que a presença de compostos fenólicos não interferiu nesses resultados. Segundo HUMPHRIES (1982), a digestibilidade das proteínas de soja é reduzida de 93 para 73% devido a presença de 1,5% de taninos.

Os valores *in vivo* obtidos na digestibilidade verdadeira para o grupo controle caseína foi 94,05% e para o grupo mantido com ração à base de CPF de cana-de-açúcar foi 53,97%. Comparando estes resultados com o ensaio *in vitro*, observa-se que a digestibilidade verdadeira da proteína ingerida pelos animais apresentaram valores pouco mais baixos devido à interferência na absorção dos aminoácidos pelo organismo do animal. As diferenças observadas entre a digestibilidade aparente e a verdadeira é que, na última, leva-se ainda em consideração o nitrogênio proveniente do próprio animal, o qual é excretado nas fezes juntamente com a proteína de origem alimentar não digerida.

McINTOSH & MANSELL (1983) verificaram para o CPF de alfafa não fracionado uma digestibilidade verdadeira de 71,7% e concluíram que este CPF tem um valor nutritivo satisfatório. CARLSSON et alii (1984), estudando o efeito das condições de tratamento sobre o valor nutritivo do CPF do capim Napier, verificaram uma variação da digestibilidade aparente de 61 a 76% e para caseína 93%. No presente trabalho, os valores obtidos

tanto para digestibilidade in vitro como para digestibilidade in vivo foram inferiores quando comparados com os da literatura para CPFs de outras plantas.

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

- folhas como as da gramínea *Saccharum officinarum*, têm o potencial de produzir proteína de boa qualidade nutricional para uso em alimentação humana e animal;

- a variação do pH durante a precipitação das proteínas, para as mesmas condições de temperatura e tempo de trabalho, exerceu efeito considerável na qualidade e quantidade das mesmas;

- a época de colheita das folhas não alterou a determinação da proteína bruta e o rendimento de extração protéica;

- a precipitação mais eficaz e o melhor produto obtido, apresentando valores mais elevados na composição de aminoácidos, elementos minerais e melhor retenção de carotenos, conseguiu-se sob condições de pH 6. Este CPF foi o mais adequado para a avaliação de sua proteína;

- as limitações de aminoácidos essenciais (aminoácidos sulfurados), alto teor de cinzas, interferiram no aproveitamento do CPF;

- o CPF de cana-de-açúcar foi bem caracterizado quimicamente e nutricionalmente, mas ainda é necessária uma ampla pesquisa toxicológica para provar sua segurança, melhorar sua digestibilidade e suas características, tais como cor e sabor;

- o RF de cana-de-açúcar poderá ser também uma boa alternativa na alimentação de ruminantes, apesar das suas limitações em aminoácidos essenciais, entretanto apresentou teores elevados em minerais e carotenóides;

- as informações básicas e técnicas deste trabalho são critérios significantes e não devem impedir o desenvolvimento e provas dessa nova fonte de proteína para sua aceitação futura.

7. RESUMO

Visando a obtenção de uma proteína alternativa e a tentativa de impedir as queimadas nos canaviais, as folhas de cana-de-açúcar foram utilizadas para produzir, em laboratório, um concentrado protéico (CPF). Investigou-se um único método de extração mecânica de proteínas utilizando água destilada como meio extrator e a adição de metabissulfito de sódio para evitar oxidação de aminoácidos sulfurados e inibir as reações fenólicas. Foi testada a precipitação das proteínas em diferentes pH's, sendo avaliado o rendimento do processo e discutidas as alterações a serem introduzidas a fim de melhorar o rendimento e a qualidade do produto. Dentre os concentrados protéicos obtidos, o termocoagulado em pH 6 (CPF2) mostrou-se quantitativamente melhor em todos os aspectos estudados. Os teores de metais pesados não foram superiores aos limites máximos de tolerância para a legislação brasileira. Os CPFs de cana-de-açúcar apresentaram-se ricos em carotenóides (8,22-8,44 mg/100 g) e teores de polifenóis totais dentro dos limites de tolerância

(abaixo de 1%). Os CPFs obtidos apresentaram diferenças significativas na sua composição centesimal e no conteúdo de aminoácidos. Algumas deficiências em aminoácidos essenciais constatadas nas folhas não foram observadas nos respectivos CPFs, embora todos os aminoácidos essenciais estivessem presentes. O escore químico dos CPFs mostrou como limitantes principais os aminoácidos sulfurados e a lisina em relação à proteína de referência. A digestibilidade *in vitro* encontrada foi de 54,30% para o concentrado protéico e 96,53% para a caseína. O CPF2 de folhas de cana-de-açúcar apresentou valores de 1,46% para o Coeficiente de Eficácia Protéica (CEP), 2,88% para a Razão Protéica Líquida (RPL) e 60,62% para a Utilização Protéica Líquida (UPL) em relação à caseína (CEP = 2,54%; RPL = 4,45% e UPL = 87,96%). A digestibilidade *in vivo* obtida foi de 53,97% para o concentrado protéico e 94,05% para a caseína. Levando-se em consideração todos os parâmetros analisados, pode-se indicar, como fonte protéica as folhas de cana-de-açúcar, pois estas têm o potencial de produzir proteína de boa qualidade nutricional para uso em alimentação humana e animal.

8. SUMMARY

Aiming the obtainment of an alternative protein and the attempt of avoiding the burn in red plots, the leaves of sugar-cane were utilized to generate a leaf protein concentrate (LPC) in laboratory. One investigated a single method of mechanical extraction of proteins using distilled water as extractor means and the addition of sodium metabisulphite to avoid oxidation of sulphuret amino-acids and inhibit the phenolic reactions. It was tested the precipitation of the proteins in different pH's, being evaluated the yield of the process and the changes to be introduced were discussed in order to improve the yield and quality of the output. Among the proteinic concentrates obtained the thermal coagulation in pH 6 (LPC2) was quantitatively better in all aspects studied. The contents of heavy metals were not higher than the maximum limits of tolerance for the brazilian legislation. The LPCs of sugar-cane leaves have presented riches in carotenes (8.22-8.44 mg/100 g) and contents of the total poliphenol substance within the limits of tolerance (below 1%).

The LPCs obtained showed significant differences in their centesimal composition and in their content of the amino-acids. Some deficiencies in essential amino-acids confirmed in the leaves were not observed in respective LPCs; although all the essential amino-acids are present. The score chemist of the LPCs showed as main limitation the sulphurous amino-acids and lysin related to the standard protein. The digestibility "in vitro" found was of 54.30% for the proteinic concentrated and 96.53% for the casein. The LPC2 of sugar-cane leaves has presented values of 1,46% for the Protein Efficiency Ratio (PER), 2,88% for the Net Protein Ratio (NPR) and 60,62% for the Net Protein Utilization (NPU) with regard to casein (PER = 2.54%; NPR = 4.45% and NPU = 87.96%). The digestibility "in vivo" obtained was of 53.97% for the protein concentrate and 94.05% for the casein. Considering all the analysed parameters, it can indicate as proteinic source, the sugar-cane leaves because those have the potential of producing good nutritional quality protein to be used in the human and animal feeding.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ABO BAKR, T.M.; MOHAMED, M.S. & MOUSTAFA, E.K. Leaf protein isolates from some Egyptian crops. *Food Chemistry, Essex*, 9:295-301, 1982.
02. AKAZAWA, T. Biochemical aspects of ribulose 1,5-biophosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo). Most abundant single protein on the earth is a key enzyme in phtosynthetic carbon assimilation. In: TASAKI, I., ed. *Recent Advances in Leaf Protein Research*. Nagoya, Today and Tomorrows' Printers & Publishehrs, 1985. p.67-8.
03. AKESON, W.R. & STHAMAN, M.A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *Journal of Nutrition, Bethesda*, 83:257-61, 1964.

04. ALMEIDA, L.B. de & PENTEADO, M. de V.C. Carotenóides com atividade pró-vitáminica A de cenouras (*Danas carota* L.) comercializadas em São Paulo. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, São Paulo, 23(2):133-41, jul./dez. 1987.
05. ARKOLL, D.B. & HOLDEN, M. Changes in chloroplast pigments during the preparation of leaf protein. *Journal of the Science Food Agriculture*, London, 24:1217-27, July/Dec. 1973.
06. AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 11.ed. Washington, 1970. 1015p.
07. _____. _____. 12.ed. Washington, 1975. 1018p.
08. _____. _____. 11.ed. Washington, 1970. 1015p.
09. _____. _____. 14.ed. Arlington, 1984. 1141p.
10. BARANIAK, B.; BARANIAK, A. & HUBIEZ, M. Fraccionation of alfafa juice protein to chloroplastic and cytoplasmatic leaf proteins concentrates by application of polyelectrolytes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON LEAF PROTEIN RESEARCH, 2, Nagoya, 1985. *Proceedings...* New Delhi, Today and ATomorrow's Publishers, 1985. p.22-9.

11. BARROS, A.M. **Variação de nitrogênio, aminoácidos, fatores antinutricionais e digestibilidade "in vitro" em leguminosas, durante fases de desenvolvimento e nos concentrados protéicos de folhas.** Belo Horizonte, UFMG, 1984. 135p. (Tese MS).

12. BARRY, T.N. & MANLEY, T.R. **Interrelationships between the concentrations of total condensed tannin, free condensed tannin and lignin in Lotus sp. and their possible consequences in ruminant nutrition.** *Journal of the Science of Food and Agriculture, Oxford*, 37:248-54, 1986.

13. BAWA, S.F. & YADAV, S.P. **Protein and mineral contents of green leafy vegetables consumed by Sokoto population.** *Journal of the Science of Food and Agriculture, Oxford*, 37:504-6, 1986.

14. BETSCHART, A. & KINSELLA, J. **Extractibility and solubility of leaf protein.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington*, 21(1):60-5, 1973.

15. BEZERRA, M.N. **Branqueamento e congelamento de cenoura (*Daucus carota* L.) cv. Brasília: características químicas, físicas e sensoriais.** Lavras, ESAL, 1990. 110p. (Tese MS).

16. BICK, L.F. **Compêndio da legislação de alimentos, consolidação das normas e padrões de alimentos.** São Paulo, Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, 1985. v.1, 220p.
17. BICKOFF, E.M.; BOOTH, A.N.; DE FREMERY, D.; EDWARDS, R.H.; KNUCKLES, B.E.; MILLER, R.E.; SAUNDERS, R.M. & KOHLER, G.O. **Nutritional evaluation of alfafa leaf protein concentrates.** In: FRIEDMAN, M. **Protein Nutritional Quality of Foods and Feeds.** New York, Marcel Bekker, Inc., 1975. p.319-40.
18. BRAY, W.J.; HUMPHRIES, C. & INERITE, M.S. **The use of solvents to decolorise leaf protein concentrate.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, 29(2):165-71, 1978.
19. BUCHANAN, R.A. **"In vivo" and "in vitro" methods of measuring nutritive value of leaf protein preparations.** *British Journal of Nutrititon*, New York, 23:533-44, 1969.
20. BUTLER, J.B. **An investigation into some cause of the differences of protein expressibility from leaf pulps.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, 33:528-36, 1982.

21. BYERS, M. The amino acid composition of some leaf protein preparations. In: PIRIE, N.W., ed. Leaf protein: its agronomy, preparation, quality and use. London, International Biological Programme, 1971. 191p.
22. BYERS, M. & STURROCK, J.M. The yields of leaf protein extracted by large scale processing of various crops. Journal of the Science of Food and Agriculture, Oxford, 16:341-55, 1965.
23. ———. Extraction of protein from the leaves of some plants growing in Ghana. Journal of the Science of Food and Agriculture, Oxford, 12:20-30, 1961.
24. CARLSSON, R. & HANCZAKOWSKI, P. The nutritive value of mixtures of white leaf protein and other foods proteins. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON LEAF PROTEIN RESEARCH, 2, Nagoya 1985. Proceedings... New Delhi, Today and Tomorrow's Printers & Publishers', 1985. p.144-5.

25. CARLSSON, R.; JOKL, L.; BARBOSA, C.F. & AMORIM, C. Effect of processing conditions on the composition and nutritive value of leaf protein concentrates from *Pennisetum purpureum* cv. Napier. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON LEAF PROTEIN RESEARCH, Aurangabad, 1982. Proceedings... New Delhi, Today and Tomorrow's Printers' and Publishers', 1984. v.11, p.209-19.
26. CHAKRABARTI, S.; BAGCHI, D.K.; CHANDA, S. & MATAI, S. Studies on biochemical composition and nutritive value of leaf protein samples of four different types of crops. In: SINGH, N. & MATAI, S., eds. Seminar on prospects and problems of green vegetation research in India. Calcutta, 1985. p.30-5.
27. COCHRAN, W.G. & COX, G.M. Experimental designs. 2.ed. New York, John Wiley, 1957. 611p.
28. DAKO, D.Y. Potential of dehydrated leaves and cocoyan leaf protein in the Ghanain diet. Nutrition Reports International, Los Altos, 23(1):181-7, Jan. 1981.

29. DANTAS, A.M.; JOKL, L.; CORRÊA, A.D. & ESPÍNDOLA, F.S.
Presença de inibidores de tripsina e polifenóis em
concentrados protéicos de folhas e efeitos do
processamento. I - Leguminosas. *Revista de Farmácia
Bioquímica da UFMG, Belo Horizonte, 11(5):101, 1990.*
30. DAWRA, R.K.; MAKKAR, K.P.S. & SINGH, B. Total phenolics,
condensed tannins, and protein-precipitable phenolics in
young and mature leaves of oak species. *Journal of
Agricultural and Food Chemistry, Washington, 36(5):951-3,
1988.*
31. DEEPCHAND, K. Leaf protein from cane tops and leaves; a
study of extraction methods. In: INTERNATIONAL CONFERENCE
ON LEAF PROTEIN RESEARCH, Aurangabad, 1982.
Proceedings... New Delhi, Today and Tomorrow's Printers
& Publishers', 1984. v.11, p.21-31.
32. DE FREMERY, D.; BICKOFF, E.M. & KOHLER, G.O. PRO-XAN
process: stability of proteins and carotenoid pigments in
freshly expressed alfafa juice. *Journal of Agricultural
Food and Chemistry, Washington, 20(6):1155-8, 1972.*

33. DE FREMERY, D.; MILLER, R.E.; EDWARDS, R.H.; KNUCLES, B.E.; BICKOFF, E.M. & KOHLER, G.O. Centrifugal separation on white and green protein fractions from alfafa juice following controlled heating. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, Washington, 21(5):886-9, 1973.
34. DOUILLARD, R. Composés lipidiques accompagnant les protéines foliaires. In: CORTES, C., ed. *Protéines Foliaires et Alimentation*. Paris, 1981. p.69-91.
35. ————. Propriétés biochimiques et physico-chimiques des protéines des feuilles. In: GODON, B., Coord. *Protéines végétales*, Paris, Lavoisier, 1985. p.211-40. (Technique et Documentation).
36. EDWARDS, R.H.; DE FREMERY, D.; MACKEY, B.E. & KOHLER, G.O. Factors affecting juice extraction and yield of leaf protein concentrate from ground alfafa. *Transactions of the ASAE*, Madison, 21(2):423-8, 1978.
37. EGGUM, B.O. & CHRISTENSEN, K.D. Influence of tannin on protein utilization in feedstuffs with special reference to barley. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Breeding for seed protein improvement*. Vienna, 1975. 135p.

38. ELLIS, R.J. Molecular chaperones: the plant connection. *Science*, Washington, 250(4983):954-9, Nov. 1990.
39. ERIKSSON, C.E. Lipid oxidation catalysts' and inhibitors' in raw material and processed foods. *Food Chemistry*, London, 9:3-19, 1982.
40. ESPÍNDOLA, F.S. Fracionamento dos vegetais verdes e obtenção de concentrados protéicos de folhas (CPF) para suplementação de alimentos e ração animal, com aproveitamento dos subprodutos. Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia. Departamento de Ciências Fisiológicas, 1987. 130p. (Monografia apresentada como relatório ao CNPq).
41. FERNANDES, A.J. Manual da cana-de-açúcar. Piracicaba, Livroceres, 1984. 196p.
42. FINLEY, J.W.; PALAVICINI, C. & KOHLER, G.O. Partial isolation and characterization of *Medicago sativa* leaf proteases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, 31(2):156-61, 1980.

43. FINOT, P.A. The influence of technological processing on the nutritional value of proteins. In: EUROPEAN CONGRESS ON PLANT PROTEINS FOR HUMAN FOOD - ABSTRACT'S OF THE LECTURES AND POSTER SESSIONS, Nantes, Institute National Recherche Agronomique, 1981. p.14.
44. FIORENTINI, R. & GALOPPINI, C. Pilot plant production of an edible alfafa protein concentrate. *Journal of Food Science*, Chicago, 46:1514-7, 1981.
45. _____ & _____. The proteins from leaves. *Qualitas Plantarum/Plant Foods for of Human Nutrition*, The Hague, 32:335-50, 1983.
46. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Energy and protein requeriments; report of a joint FAO/WHO*. Geneva, WHO; FAO, Rome, 1973. p.62-4. (WHO Technical Report Series, 522; FAO Nutrition Meetings Report Series, 52).
47. FOOD AND NUTRITION BOARD. *Recommended dietary allowances*. 9.ed. Washington, National Academy of Sciences National Research Council, 1980.

48. GALOPPINI, C. & FIORENTINI, R. Leaf protein as human food.
In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON LEAF PROTEIN RESEARCH, 2,
Nagoya. Proceedings... New Delhi, Today and Tomorrows'
Printers & Publishers', 1985. p.50-7.
49. GOLDSTEIN, J.L. & SWAIN, T. Changes in tannin in ripening
fruits. *Phytochemistry*, Oxford, 2:371-83, 1963.
50. GOMIDE, J.A. Composição mineral de gramíneas e leguminosas
forrageiras tropicais. In: SIMPÓSIO LATINOAMERICANO SOBRE
PESQUISA EM NUTRIÇÃO MINERAL DE RUMINANTES EM PASTAGENS,
Belo Horizonte, 1976. Simpósio... Belo Horizonte,
UFMG/UFV/EPAMIG/USAID, 1976. p.20-33.
51. HATANAKA, A.; SERIVA, J. & KAJIWARA, I. Distribution of an
enzyme system producing cis-3 hexanal from linolenic and
linoleic acids in some plants. *Phytochemistry*, Elmsford,
17:869-72, 1978.
52. HIGBY, W.K. A simplified method for determination of some
aspects of the carotenoid distribution in natural and
carotene - fortified orange juice. *Journal of Food
Science*, Chicago, 27:42-9, 1962.

53. HIRS, C.H.W. Performic acid oxidation. In: ———. **Methods in enzymology**. New York, Academic Press, 1967. v.11, p.179-99.
54. Horigone, T.; CHO, Y.S.; UCHIDA, S. & SAKAGUCHI, E. Effects of the leaf protein on serum cholesterol levels in rats. In: TASAKI, I., ed. **Recent Advances in Leaf Protein Research**. Nagoya, Today and Tomorrows' Printers & Publishers, 1985. p.157-9.
55. ———; KIM, J.K. & UCHIDA, S. Nutritive quality of leaf proteins coagulated at different pH. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, 29:611-20, Mar. 1983.
56. HUANG, H.: JOHANNING, G.K. & O'DELL, B.L. Phenolic acid content of food plants and possible nutritional implications. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Washington, 34(1):48-51, 1986.
57. HUDSON, B.J.F. & KARIS, I.G. Aspects of vegetable structural lipids. I. The lipids of leaf protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, 24(12):1541-50, 1973.

58. HUGLI, T.E. & MOORE, S. Determination of the tryptophan content of protein by ion-exchange chromatography of alkaline hidrolysates. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, (247):2828-34, 1972.
59. HUMPHRIES, C. Towards leaf protein as a human food. In: HUDSON, B.J.F., ed. *Food Protein - 1*, London, 1982. p.263-8.
60. HURRELL, R.F.; FINOT, P.A. & CUQ, J.L. Protein polyphenol reactions, 1. Nutritional and metabolic consequences of the reaction between oxidized caffeic acid and the lysine residues of casein. *British Journal of Nutrition*, New York, 47:191-211, 1982.
61. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 2.ed. São Paulo, 1977. v.1, 71p.
62. KAMALANATHAN, G.; DEVADAS, R.P. & VIJAYALAKSHMI, P. Nutrition education for popularizing leaf protein. In: *INTERNATIONAL CONFERENCE ON LEAF PROTEIN RESEARCH, 2, 1985. Nagoya, Proceedings... Today and Tomorrows'* Printers & Publishers, 1985. p.243-4.

63. KNUCKLES, B.E.; EDWARDS, R.H. & KOHLER, O.G. & WHITNEY, L.F.
Floculants in the separation of green and soluble white
protein fraction from alfafa. *Journal of Agricultural and
Food Chemistry*, Washington, 28(1):32-6, 1980b.
64. _____; _____; MILLER, R.E. & KOHLER, O.G. Pilot scale
ultrafiltration of clarified alfafa juice. *Journal of
Food Science*, Chicago, 45(3):730-44, 1980a.
65. KOHLER, G.O. & KNUCKLES, B.E. Edible protein from leaves.
Food Technology, New York, 31:191-5, May 1977.
66. _____ & LYON, C.K. Plant protein sources. In: WHITAKER,
J.R. & TANNENBAUM, S.R. *Food Proteins*. Westport, AVI
Publishing Company Inc., 1977. 603p.
67. KUC, J. Phytoalexins. *Encyclopedie Plant Physiology*, New
Serie, 4:632-52, 1976.
68. LEWIS, M.J. Concentration of protein by ultrafiltration.
In: HUDSON, B.J.F., ed. *Development in Food Proteins - 1*.
London, 1982. p.91-3.

69. LEXANDER, K.; CARLSSON, R.; SCHALÉN, V.; SIMONSSON, A. & LUNDBORG, T. Quantities and qualities of leaf protein concentrates from wild species and crop species grown under controlled conditions. *Annual Applied Biology*, London, 66:1-24, 1970.
70. LIVINGSTONE, A.L.; KOHLER, G.O. & KUSMICKY, D.D. Comparison of carotenoid storage stability in alfafa leaf protein (Pro-Xan) and dehydrated meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, 28(3):652-8, 1980.
71. LU, P. & KINSELLA, J.E. Extractability and properties of protein from alfafa leaf meal. *Journal of Food Science*, Chicago, 37:94-9, 1972.
72. McINTOSH, C.A. & MANSELL, R.L. Distribution of limonin during the growth and development of leaves and branches of *Citrus paradisi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, 31:319-25, 1983.
73. MANGALAN, S.M.D. & SABNIS, S.D. Nutritional and phytochemical aspects of some vegetables of centrospermae. *Journal of Economy and Taxonomy Botanic*, New York, 13(1):227-30, 1989.

74. MAKKAR, H.P.S.; DAWRA, R.K. & SINGH, B. Changes in tannin content, polymerisation and protein precipitation capacity in oak (*Avercus incana*) leaves with maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, 44:301-7, 1988.
75. MARION, D. & DOUILLARD, R. Les interactions des protéines et des lipides dans les produits vegetaux. In: GODON, B., coord. *Protéines végétales*. Paris, Lavoisier, 1985. p.269-79. (Technique et Documentation).
76. MISRA, P.N.; PAL, M. & PANDEY, R.M. Estudios sobre el efecto de variacion en la densidad de plantas, sobre el crecimiento y rendimiento del Amaranto de semilla (*Amaranthus hypocondriacus*, L.). *Boletim el Amaranto y su Potencial*. nº 3, Setembro 1985.
77. MONTIES, B. Les antinutritionnels. In: CORTES, C., ed. "Protéines foliaires et alimentation". Paris, Gauthier-Villars, 1981, p.83-120.
78. MOORE, S. & STEIN, W.H. Cromatography of aminoacids on sulphonated polystyrene resins. *The Journal of Biological Cemistry*, Baltimore, 192(2):663-81, Oct. 1951.

79. MORRISON, J.E. & PIRIE, N.W. The large scale production of protein from leaf extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, 12(1):1-5, 1961.
80. MUELLER-HARVEY, I; REED, J.D. & HARTLEY, R.D. Characterisation of phenolic compounds, including flavonoids and tannis, of ten Ethiopian browse species by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, 39:1-14, 1987.
81. NAGY, S.; TELEK, L.; HALL, N.T. & BERRY, R.E. Potential foods uses for protein from tropical and subtropical plant leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, 26(5):1016-27, 1978.
82. NANDA, C.L.; TERNOUTH, J.H. & KONDOS, A.C. Evaluation of the nutritive value of plant protein concentrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Oxford, 28:1075-9, 1977.
83. NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 153(1):375-80, 1944.

84. OH, H.I.; HOFF, J.E.; ARMSTRONG, G.S. & LAWRENCE, A.H.
Hydrophobic interaction in tannin protein complexes.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington,
28:394-8, 1980.
85. OPIENSKA-BLAUTH, J. A new rapid method of determining
tryptopham. *Analytical Biochemistry*, New York, 6(1):69-
76, 1963.
86. ORLANDO, J.O.F.; BATAGLIA, O.C. & CAMPOS, H. Influência de
processos de limpeza das amostras na diagnose foliar em
cana-de-açúcar. *Brasil Açúcareiro*, Rio de Janeiro,
86(2):15-29, ago. 1975.
87. OSBORNE, T.B. & WAKEMAN, A.J. Leaf protein as a human food.
Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 42:1, 1920.
88. OSTROWSKI-MEISSNER, T.M. Quantities and quality of protein
extracted from pasture herbage using heat precipitation or
ultrafiltration procedures. *Journal of the Science Food
and Agriculture*, London, 31:177-87, 1980.

89. OSTROWSKI-MEISSNER, T.M. Social trends emerging in a Mexican village community involved in a leaf nutrient supplementation project offered as a nutritional scheme. In: TASAKI, I., ed. **Recent Advances in Leaf Protein Research.** Nagoya, Today and Tomorrow's Printers & Publishers, 1985. p.110-5.
90. PARRISH, G.K.; KOGER, M. & WEAVER, J.C. The properties of leaf protein as a human and a close look at alfafa. **CRC British Reviews in Food Technology**, Boca Raton, 5(1):1-13, 1974.
91. PELLETT, P.L. & YOUNG, V.R., ed. **Nutritional evaluation of protein foods.** Tokyo, The United Nations University, 1980. 154p.
92. PHELOUNG, P. & BRADY, C.J. Soluble and fraction 1 protein in leaves of C3 and C4 grasses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, 30:246-50, 1979.
93. PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental.** 10.ed. São Paulo, Nobel, 1982. 430p.
94. PIRIE, N.W. **Leaf protein and other aspects of fodder fractionation.** Cambridge, Cambridge University Press, 1978. 183p.

95. PIRIE, N.W. **Leaf protein: its agronomy, preparation, quality and use.** London, Blackwell Science Publications, 1971. (IBP Handbook, 20), 192p.
96. RODRIGUES, A.E.C.; FREITAS, E.J.G. & LOPES, J. **Pontas de cana x cana-de-açúcar integral.** Anuário Técnico do Instituto de Pesquisas Zootécnicas - "Francisco Osório", Porto Alegre, 3:185-201, 1976.
97. ROY, H. **Rubisco assembly: a model system for studying the mechanism of chaperonin action.** American Society of Plant Physiologists, The Plant Cell, New York, 1:1035-42, Nov. 1989.
98. SALUNKHE, D.K.; JADHAV, S.J.; KADAM, S.S. & CHAVAN, J.K. **Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereals and legumes.** CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, 17:277-305, 1982.
99. SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. **Análise química em plantas.** Piracicaba, ESALQ/USP, 1974. 56p.

100. SATTERLEE, L.D. The views of a food scientist on promises and problems of leaf protein incorporated into our foods. *Transactions of the ASAE*, St. Joseph, 23(1):237-41, Jan./Feb. 1980.
101. SAUNDERS, R.M.; CONNOR, M.A.; BOOTH, A.N.; BICKOFF, E.M. & KOHLER, G.O. Measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by "in vivo" and "in vitro" methods. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, 103:530-5, 1973.
102. SAUVANT, D. Protéines foliaires en alimentation animale. In: CORTES, C., ed. *Protéines foliaires et alimentation*. Paris, 1981. p.211-27.
103. SGARBIERI, V. *Alimentação e nutrição*. São Paulo, Almed, 1987. 387p.
104. ———. Potencial das proteínas de folhas na alimentação animal e humana. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 38:8-25, 1976.
105. SILVESTRE-MARINHO, M. & JOKL, L. Composição química de resíduos fibrosos de algumas plantas brasileiras. *Revista de Farmácia Bioquímica da UFMG*, Belo Horizonte, 5:45-54, 1983.

106. SIMOPOULOS, A.P. & SALEN Jr., N. Purslane: a terrestrial source of omega-3 fatty acids. *New England Journal of Medicine*, Boston, 315(13):833-40, 1986.
107. SINGH, G. Nutritional evaluation of some leaf protein preparations. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON LEAF PROTEIN RESEARCH, Aurangabad, 1982. *Proceedings...* New Delhi, Today and Tomorrows' Printers' & Publishers, 1984. v.11, p.301-5.
108. SINGH, N. Feeding trials with children. In: PIRIE, N.W., ed. *Leaf protein, its agronomy preparation, quality and use*. Oxford, England, 1971. p.113-20.
109. ———. Scope of carotene-rich leaf protein for food use. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON LEAF PROTEIN RESEARCH, Aurangabad, 1982. *Proceedings...* New Delhi, Today and Tomorrows' Printers & Publishers, 1984. v.11, p.481-90.
110. SINGLETON, V.L. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Advances in Food Research*, New York, 27:149-242, 1981.
111. SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. & MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. *Analytical Chemistry*, Washington, 30(7):190-206, July 1958.

112. SPENCER, R.R.; MOTTOLA, A.C.; BICKOFF, E.M.; CLARK, J.P. & KOHLER, G.O. The PRO-XAN process; the design and evaluation of a pilot plant system for the coagulation and separation of the leaf proteins from alfalfa juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, 10:504-7, 1971.
113. SRIPAD, G. & NARASINGA RAO, M.S. Effect of methods to remove polyphenols from sunflower meal on the physicochemical properties of the proteins. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, Washington, 35(6):962-7, 1987.
114. SUBBA RAU, B.H.; RAMANA, K.V.R. & SINGH, N. Studies on nutritive value of leaf proteins and some factors affecting their quality. *Journal of the Science Food and Agriculture*, London, 23:233-45, 1972.
115. SWAIN, T. & HILLIS, W.G. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, 10:63-8, Jan. 1959.
116. TASAKI, I. Progress in researches on nutritive value of leaf protein concentrate and its by-product in Japan. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON LEAF PROTEIN RESEARCH, 2, Nagoya. Proceedings... New Delhi, Today and Tomorrows'.. Printers & Publishers, 1985. p.101-8.

117. TELEK, L. & MARTIN, F.W. Tropical plants for leaf protein concentrates. In: TELEK, L. & GRAHAM, H.D., eds. Leaf protein concentrates, Westport, 1983. p.81-116.
118. TOZZI, M.G.; BALESTRERI, E.; CAMICI, M.; FELICIOLE, R. & OPATA, P.C. Partial purification and characterization of a proteolytic activity of alfafa juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, 29:1075-8, 1981.
119. VITTI, G.C. & NOVAES, N.J. Adubação com enxofre. In: SIMPÓSIO SOBRE CALAGEM E ADUBAÇÃO DE PASTAGENS, 1, Nova Odessa, 1985. Anais... Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1986. p.191-231.
120. WATKINS, C.B.; HAKI, J.M. & FRENKEL, C. Activities of polygalacturonase, α -D-mannosidase, and α -D- and β -D-galactosidase in ripening tomato. HortScience, St. Joseph, 23(1):192-4, 1988.
121. WHEELER, E.L. & FINLEY, J.W. Lipoxigenase in the expressed juice of alfafa leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, 29(5):912-4, 1981.

122. WOLZAK, A.; ELIAS, L.G. & BRESSANI, R. Protein quality of vegetable proteins as determined by traditional biological methods and rapid chemical assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, 29:1063-8, 1981.
123. ZUCKER, W.V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. *American Naturalist*, Chicago, 121:335-65, 1983.

APÊNDICE

QUADRO 1 - Resumo da análise de variância apresentando os quadrados médios e significância centesimal dos diferentes CPFs. ESAL-Lavras-MG, 1991.

Causas de variação	GL	QM* e significância					
		PB	FB	EE	C	CHO	MS
Métodos	3	11,56**	6,55**	9,12**	10,80**	34,06**	2,19**
Resíduos	8	1,273	0,141	0,554	0,178	1,9449	0,19
C.V. (%)		2,5	6,54	3,27	5,29	7,63	0,47

* Os quadrados médios das variáveis seguidas por *, ** são estatisticamente significantes ao nível de 5% e 1%, respectivamente.

QUADRO 2 - Resumo da análise de variância apresentando os quadrados médios e significância para elementos minerais (macronutrientes) referentes aos CPFs. ESAL-Lavras-MG, 1991.

Causas de variação	GL	QM* e significância				
		P	K	Ca	Mg	S
Métodos		0,0005*	0,0121**	0,4058**	0,0071**	0,0013**
Resíduos		0,00007	0,00004	0,01002	0,00002	0,00007
C.V. (%)		5,86	3,44	10,29	3,67	2,81

* Os quadrados médios das variáveis seguidas por *, ** são estatisticamente significantes ao nível de 5% e 1%, respectivamente.

QUADRO 3 - Resumo das análises de variância apresentando os quadrados médios e significância para elementos minerais (micronutrientes) referentes aos CPFs obtidos por termocoagulação. ESAL-Lavras-MG, 1991.

Causas de variação	GL	QM* e significância				
		Cu	Zn	Fe	Mn	B
Métodos	3	5072,5**	6128,6**	54078,88**	0,0071**	12,4**
Resíduos	8	0,68	0,22	11415,44	1,95	0,15
C.V. (%)		0,73	0,69	1,87	2,01	4,06

* Os quadrados médios das variáveis seguidas por *, ** são estatisticamente significantes ao nível de 5% e 1%, respectivamente.

QUADRO 4 - Resumo das análises de variância apresentando os quadrados médios e significância para carotenóides totais, açúcares totais, redutores (glicose), não redutores (sacarose) e amido referentes aos CPFs. ESAL-Lavras-MG, 1991.

Causas de variação	GL	QM* e significância				
		Carotenóides totais	Açúcares totais	Açúcares red. (glicose)	Açúcares não redut.	Amido
Métodos	3	0,0323 n.s	0,0015**	0,0029**	0,008**	0,3565 n.s
Resíduos	8	0,075	0,00003	0,00001	0,00002	0,1818
C.V. (%)		3,26	2,42	2,07	5,99	9,78

* Os quadrados médios das variáveis seguidas por *, ** são estatisticamente significantes ao nível de 5% e 1%, respectivamente.

QUADRO 5 - Resumo da análise de variância apresentando os quadrados médios e significância para compostos fenólicos extraíveis em metanol, água, metanol 50% e fenólicos totais referentes aos CPFs. KSAL-Lavras-MG, 1991.

Causas de variação	GL	QM* e significância			
		Fenólicos (metanol)	Fenólicos (água)	Fenólicos (metanol 50%)	Fenólicos totais
Métodos	3	10735,73*	2010,82 n.s.	2590,19 n.s.	11724,31 n.s.
Resíduos	4	715,71	920,20	408,99	2249,22
C.V. (%)		7,88	10,22	4,64	4,42

* O quadrados médio da variável seguida por *, ** é estatisticamente significantes ao nível de 5% e 1%, respectivamente.

QUADRO 6 - Resumo das análises de variância apresentando os quadrados médios e significância para aminoácidos essenciais referentes aos CPFs de cana-de-açúcar. Dez./91. ESAL-Lavras-MG.

Causas de variação	G.L.	QM+ e significância							
		Valina	Isoleucina	Leucina	Lisina	Triptofano	Treonina	Met.+ Cist	Fenil. + Tiros.
Métodos	3	1,33 ns	0,85 ns	1,66 ns	1,07†	0,14†	0,23 ns	0,14 ns	2,04 ns
Resíduos	4	0,41	0,17	0,32	0,08	0,01	0,07	0,17	0,63
C.V. (%)		13,11	10,62	6,51	6,20	6,99	6,43	18,01	9,09

† O quadrado médio da variável seguida por †, †† são estatisticamente significantes ao nível de 5% e de 1%, respectivamente.

QUADRO 7 - Resumo das análises de variância relativas a eficiência alimentar (CEA), coeficiente de eficácia protéica (CEP) e razão protéica líquida (RPL).

Causas de variação	GL	QM** e significância		
		CEA	CEP	RPL
Dieta	1	0,0361**	4,6225**	9,9225**
Resíduo	14	0,00035	0,0412	0,1191
C.V. (%)		10,3	10,1	9,4

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO 8 - Resumo das análises de variância relativas a utilização protéica líquida (UPL), digestibilidade aparente (Da), digestibilidade verdadeira (Dv) e digestibilidade "in vitro".

Causas de variação	GL	QM** e significância			
		UPL	Da	Dv	D "in vitro"
Dieta	1	1381,9	3163,4**	3274,8**	4139,7**
Resíduo	14	25,5	0,346	0,397	4,914
C.V. (%)		8,34	0,98	1,02	3,49

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO 9 - Resumos das correlações entre análises nutricionais.

Variáveis	Coefficiente de correlação (r)
CEP x RPL	0,9880**
CEP x UPL	0,9377**
CEP x Da	0,9455**
CEP x D "in vitro"	0,9509**
CEA x RPL	0,9895**
CEA x UPL	0,9437**
CEA x Da	0,9417**
CEA x D "in vitro"	0,9448**
RPL x UPL	0,9285**
RPL x Da	0,9276**
RPL x D "in vitro"	0,9320**
UPL x Da	0,8882**
UPL x D "in vitro"	0,8866**
Da x Dv	0,9999**
Da x D "in vitro"	0,9910**
Dv x D "in vitro"	0,9904**

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO 10 - Teores médios proteína bruta (%) nos CPFs em diferentes épocas de colheita e diferentes pH's de extração.

Épocas	Métodos (pH's)				Média
	3,5	5,5-5,8	6,0	8,0	
Julho	42,73 aA	45,90 aA	47,38 aA	45,05 aA	45,27
Outubro	42,53 aA	45,55 aA	47,29 aA	44,93 aA	45,08
Dezembro	42,39 aA	45,81 aA	47,08 aA	45,11 aA	45,10
Média	42,55	45,75	47,25	45,03	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma coluna e maiúscula na mesma linha, não diferem ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

QUADRO 11 - Teores médios percentuais de rendimento de extração protéica nas diferentes épocas de colheita e diferentes pH's de extração.

Épocas	Métodos (pH's)				Média
	3,5	5,5-5,8	6,0	8,0	
Julho	32,96 aA	23,63 aA	26,48 aA	12,87 aA	23,98 a
Outubro	32,52 aA	23,48 aA	25,89 aA	12,55 aA	23,61 a
Dezembro	34,46 aA	23,72 aA	26,47 aA	13,07 aA	24,43 a
Média	33,31 A	23,61 A	26,28 A	12,83 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma coluna e maiúscula na mesma linha, não diferem ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

QUADRO 12 - Resumo de análises de variância relativos ao teor de proteína bruta (% em MS) e rendimento protéico de CPFs de cana-de-açúcar em diferentes épocas de colheita.

Causas de variação	G.L.	Quadrados médios	
		Proteína bruta	Rendimento
CPF	3	11,5164**	315,4491**
Colheita	2	0,0431 n.s.	0,4461 n.s.
CPF x colheita	6	0,0166 n.s.	0,0321 n.s.
Resíduo	24	1,4805	4,2196
C.V. (%)		2,88	7,095

n.s. não significativo.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.