

SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO LEITE DE BABAÇU UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Diana Lopes da Silva¹, Abraham Damian Giraldo Zuñiga², Jane Sélia dos Reis Coimbra³, Aroldo Arévalo Pinedo⁴, Edwin Elard Garcia Rojas⁵

¹Bolsista de Iniciação Científica do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins (didilopess@uft.edu.br)

²Professor Doutor do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins

³Professora Doutora do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa

⁴Professor Doutor do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins

⁵Professor Doutor da Universidade Federal Fluminense

RESUMO

Palmeira oleaginosa, cientificamente chamada de *Orbignya martiana*, o babaçu é de grande valor industrial e comercial. No entanto, o leite de babaçu não tem uma característica bem definida quanto a seus constituintes, em especial as proteínas. Uma técnica de purificação economicamente viável, é a partição de biomoléculas por extração líquido-líquido em Sistemas Aquosos Bifásicos. O presente trabalho teve como objetivo identificar as proteínas presentes no leite de coco babaçu mediante a técnica de eletroforese e selecionar e caracterizar sistema aquoso bifásico, composto por polietilenoglicol (PEG)+Fosfato de potássio + Água, mais adequado à separação das proteínas do leite de babaçu, quanto às propriedades físico-químicas, como densidade e viscosidade, que são afetadas pela concentração dos constituintes, coeficiente de partição, porcentagem dos constituintes e relação de volume de fases. O leite de babaçu extraído das amêndoas apresentou um teor elevado de proteínas e estudos mais aprofundados ainda precisam ser realizados para a identificação das mesmas.

PALAVRAS-CHAVES: eletroforese, babaçu, *Orbignya martiana*, proteínas, Sistemas Aquosos Bifásicos

SEPARATION OF MILK PROTEINS BABASSU USING AQUEOUS BIPHASIC SYSTEMS.

ABSTRACT

Oil palm, scientifically known as *Orbignya Martiana*, the babassu is of great industrial and commercial value. However, the babassu milk has a feature set as well to their constituents, especially proteins. A purification technique economically feasible, is the partition of biomolecules by liquid-liquid extraction in Aqueous Biphasic Systems. This study aimed to identify the proteins present in the babassu coconut milk by electrophoresis technique and to select and characterize aqueous biphasic system, com-

posed of polyethylene glycol (PEG) + water + potassium phosphate, better suited to the separation of milk proteins babassu, regarding the physical and chemical properties such as density and viscosity, which are affected by the concentration of constituents, partition coefficient, percentage of the constituents and the volume ratio of phases. The milk extracted from kernels of babassu showed a high content of protein and further studies remain to be conducted to identify these individuals.

KEYWORDS: electrophoresis, babassu *Orbignya Martiana*, proteins, Aqueous Biphasic Systems

INTRODUÇÃO

Entre as espécies de palmeiras utilizadas na indústria extrativista brasileira está o babaçu, a mais rica do ponto de vista econômico, pois é aproveitada integralmente. Palmeira oleaginosa, cientificamente chamada de *Orbignya martiana*, o babaçu é de grande valor industrial e comercial e é encontrado em extensas formações naturais em estados como Maranhão, Piauí e Tocantins. No Estado do Tocantins, a maior concentração de babaçuais está localizado na região do Bico do Papagaio (BRASIL, 2010).

A palmeira atinge cerca de 17 a 20 metros de altura, e começa a frutificar entre o 7º e 8º ano de vida, alcançando plena produção aos 15 anos, e tem uma vida média de 35 anos. Produz de 3 a 6 cachos de frutos por ano, cada cacho possui cerca de 150 a 300 cocos, e cada coco possui em média, 3 ou 4 amêndoas no interior (BEZERRA, 1995).

O extrato solúvel (“leite”) é uma opção alimentar nutritiva e econômica, que pode atender às necessidades das pessoas que buscam alimentos mais saudáveis, livres de colesterol, ou para aqueles que não gostam do leite de vaca ou não podem consumi-los (intolerância à lactose) (ASAMI, 2005).

O leite de babaçu atualmente é produzido artesanalmente na região onde ocorre o fruto, é consumido puro, principalmente na alimentação infantil, culinária e bebidas. No entanto, não tem uma característica bem definida quanto a seus constituintes, em especial as proteínas, macromoléculas que cumprem um importante papel na funcionalidade dos alimentos (LIRA, 2006).

Este extrato solúvel é um subproduto do fruto que vem se destacando na culinária local com reconhecimento regional, no entanto, estudos como os realizados no coco da Bahia (*Cocos nucifera* L.), são quase inexistentes (SOLER et al, 2007). As proteínas do leite de babaçu que apresentam suas características ainda desconhecidas (nas literaturas pesquisadas) aparecem como ótimas matérias à pesquisa de suas estruturas e propriedades funcionais (LIRA, 2006).

É constante a busca por processos de separação e purificação de biomoléculas, que possam ser aplicados em escala contínua e que sejam técnica e economicamente viáveis, assim como de fácil aumento de escala, onde possam ser obtidas frações com elevados níveis de pureza. Uma das técnicas de purificação que abrangem esses critérios é a partição de biomoléculas por extração líquido-líquido em Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB), ou seja, entre duas ou mais fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis. A extração com SAB permite isolar biomoléculas de misturas complexas e oferece vantagens, como curto tempo de processamento, fácil aumento de escala, além de ser meio adequado para o

trabalho com compostos de origem biológica, pelo fato de as fases serem constituídas de 70% a 90% de água (ZUÑIGA et al, 2006). Os SAB's são formados quando dois polímeros ou um polímero e um sal são misturados acima de certas concentrações. São constituídos por duas fases imiscíveis, que promovem a separação de solutos, provenientes ou não da biotecnologia. Esses tipos de sistemas resultam da incompatibilidade, em soluções, de dois polímeros, como o polietilenoglicol (PEG) e dextrana (Dex), ou entre um polímero e um sal, como PEG e fosfato de potássio (FFP). (COIMBRA, 2003).

Assim o presente trabalho teve por objetivo identificar as proteínas presentes no leite de coco babaçu mediante a técnica de eletroforese, assim como selecionar e caracterizar o sistema aquoso bifásico, composto por polietilenoglicol (PEG)+Fosfato de potássio + Água, mais adequado à separação das proteínas do leite de babaçu.

METODOLOGIA

Utilizou-se como matéria-prima amêndoa de babaçu (*Orbygnia speciosa*), proveniente da região do Município de Palmas-TO.

Obtenção do Leite de Babaçu

Para obtenção do leite, as amêndoas foram pesadas e lavadas com água corrente para retirada de sujidades grosseiras como areia, palha e materiais indesejáveis. Após prévia seleção, foram despeliculadas (retirada da película marrom que recobre a amêndoa) manualmente com auxílio de facas de aço inoxidável, lavadas em água clorada e branqueadas em água a 80 °C por 10 minutos segundo metodologia de PINEDO et al (2008).

Quantificação das proteínas

Foi realizada usando o método de biureto. Em um tubo de ensaio, foram colocados 4 mL do reagente de biureto e 1 mL do leite de babaçu. Após o repouso de 30 min, foi lida a absorbância a 540 nm. A concentração de proteína da amostra foi determinada por comparação com curva padrão. A curva padrão foi obtida pela reação do reagente de biureto com quantidades crescentes de albumina de soro bovino em água, utilizando a regressão linear determinada pelo método dos mínimos quadrados, que apresenta coeficiente de regressão linear, r^2 , próximo da unidade.

Identificação das proteínas por SDS PAGE

As proteínas do leite de babaçu foram analisadas qualitativamente mediante eletroforese SDS-PAGE, seguindo a metodologia descrita por LAEMMLI (1970), com concentrações de 15%, 20%, 25% e 30% de acrilamida no gel de separação e 4,5% no gel de empilhamento. A corrida foi iniciada com 60 V no gel de empilhamento e posteriormente aumentada para 120V no gel de separação. Visando obter bandas das proteínas bem definidas e por se tratar de uma matéria-prima ainda desconhecida, foram utilizadas amostras in natura do leite de babaçu e um marcador de proteínas padrão (SIGMA MARKER, mol wt 6,5kDa – 200 kDa)

Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Para o preparo do Sistema de fases, os reagentes usados foram polietilenoglicol de massas molares 1500, 4000 e 6000 daltons, fosfato de potássio

monobásico e dibásico e leite de babaçu. O preparo do sistema foi realizado segundo metodologia descrita por Zuñiga, 2001.

Relação de volume das fases

Para os sistemas PEG-FFP foram determinadas a relação de volume entre as fases, calculadas através da razão entre o volume da fases inferior (rica em FFP) e o volume da fases superior (rica em PEG). Esta relação foi obtida pela determinação dos volumes das fases ao variar as concentrações de polímero, sal e massa molar de PEG.

Partição em Sistemas Aquosos Bifásicos

Nos sistemas pré-selecionados foi incorporado leite de babaçu, até ser completado o volume de 10mL. Esta mistura foi agitada e após a agitação, permaneceu em repouso por 24 horas para a decantação, até atingir o estado de equilíbrio. As fases foram separadas e alíquotas foram retiradas, para a quantificação da concentração das proteínas segundo a reação de Biureto (ZAIA et al, 1998), com leitura da absorbância de 540 nm empregando o espectrofotômetro.

Determinação do coeficiente de Partição

O coeficiente de partição foi calculado por meio da seguinte equação:

$$k \equiv \frac{C_t}{C_b};$$

Em que k é o coeficiente de partição, C_t e C_b são as concentrações da molécula de interesse nas fases superior e inferior respectivamente

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo tradicional de extração do leite de babaçu não contempla a etapa de centrifugação do produto. Para a análise de proteína, fez-se necessária essa etapa, pois a gordura presente no extrato solúvel poderia prejudicar a leitura das amostras.

A curva analítica obtida com soluções de Albumina de Soro Bovino está representada na Figura 1.

Pode-se observar que o coeficiente de correlação foi elevado.

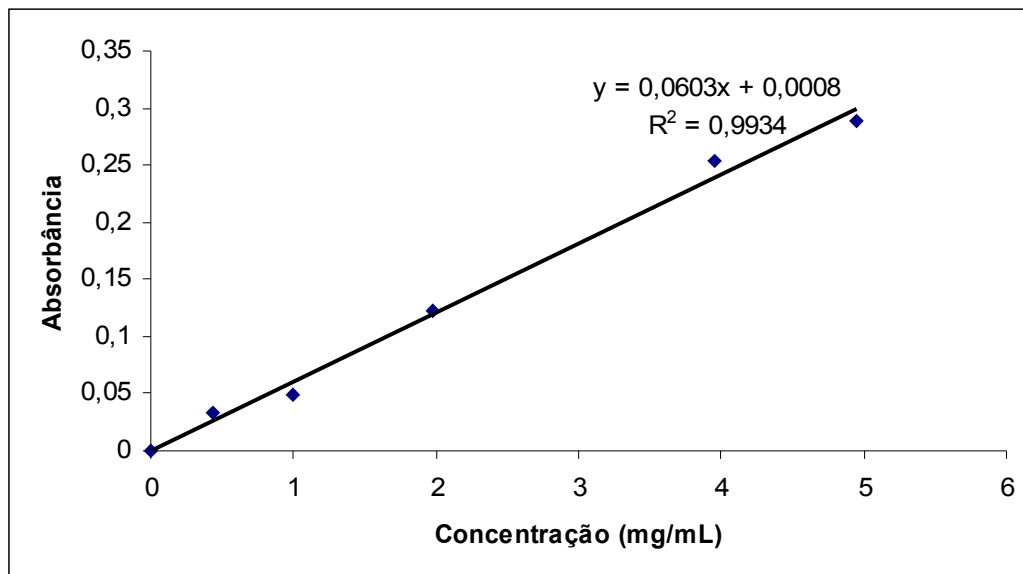


FIGURA 1: Curva padrão para a proteína BSA.
FONTE: Os autores

A quantidade de proteína encontrada para as amostras de leite de babaçu foi de 12,4%. Quando o mesmo leite foi submetido à centrifugação, o teor de proteína diminuiu para 6,55%. Essa diferença é explicada pelo fato da gordura presente no leite provocar turbidez nas amostras, com conseqüente aumento da absorção das mesmas (ZAIA et al, 1998). Por esse motivo, o leite centrifugado deve ser utilizado para a eletroforese.

No estudo de CARDARELLI & OLIVEIRA (2000), o processo tecnológico de obtenção do leite de castanha-do-pará levou a um produto com um teor de proteína de 21,19% sobre a matéria-seca.

O leite de babaçu apresenta um elevado teor de proteínas se comparado, ao leite de vaca, onde SGARBIERI encontrou um teor de 3,30%.

Das diversas condições testadas no procedimento experimental da eletroforese, o melhor resultado obtido foi com o gel e separação em poliacrilamida a 30%, com aplicação de uma voltagem inicial de 60V e posteriormente a aplicação da voltagem de 120 V, sendo que o tempo de corrida no gel de empilhamento foi de aproximadamente 1h e 20 minutos e no gel de corrida 5 horas.

Analisando o perfil eletroforético, verificou-se a presença de sete principais bandas de proteínas, com massas moleculares entre 29 kD e 200 kDa.

Considerando a mobilidade das proteínas no gel pode-se observar na Figura 2 que sua variação é de acordo com a massa molar das proteínas, como esperado e relatado por ALFENAS (1998).

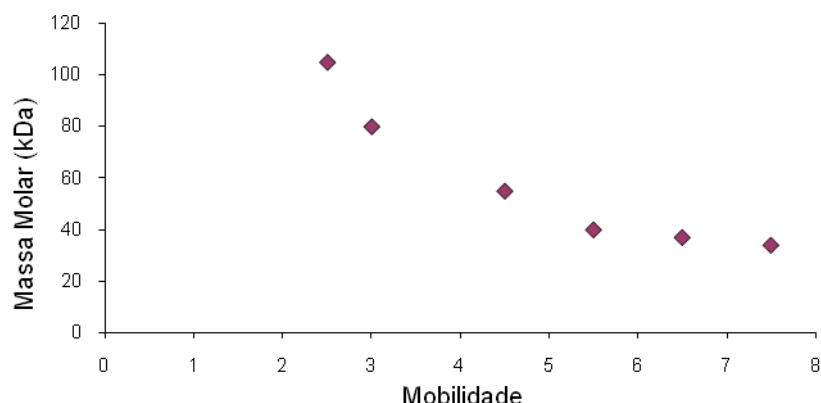


FIGURA 2. Comparação das massas molares das proteínas com a mobilidade eletroforética.

FONTE: Os autores

Na Figura 3, percebemos as bandas do marcador de proteínas padrão e das amostras. Da esquerda para direita, as três primeiras colunas correspondem ao padrão de proteínas; a quarta e quinta às amostras in natura com 50µL.

Levando em consideração as bandas obtidas nas amostras, podemos ter uma estimativa dos pesos moleculares de suas proteínas quando as comparamos com as bandas do padrão.

A banda de número 1 tem uma massa molecular acima de 200kDa quando comparada com o padrão (A), a banda 2 tem um peso molecular aproximado de 106 kDa, situando-se entre os padrões de β -galactose (B) de 116 kDa e fosforilase (C) de 97 kDa; a proteína presente na banda de número 3 mostrou ter uma massa molar entre 97 kDa (C) e 66 kDa (D). Na banda de número 4, consideramos uma massa molecular igual a 55 kDa correspondente de forma idêntica ao padrão de glutamato desidrogenase (E) de 55 kDa.

Nas bandas 5 e 6 podemos afirmar que as proteínas presentes encontram-se na faixa de 45 kDa e 36 kDa, sendo que a banda 5 tem massa molecular superior a 6 (ovalbumina de ovo de galinha (F), 45 kDa e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (G), 36 kDa).

Por fim, a banda 7, entre 36 kDa e 29 kDa (G: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho, 36 kDa e H: carbonato anidrase de eritrócitos bovinos, 29 kDa).

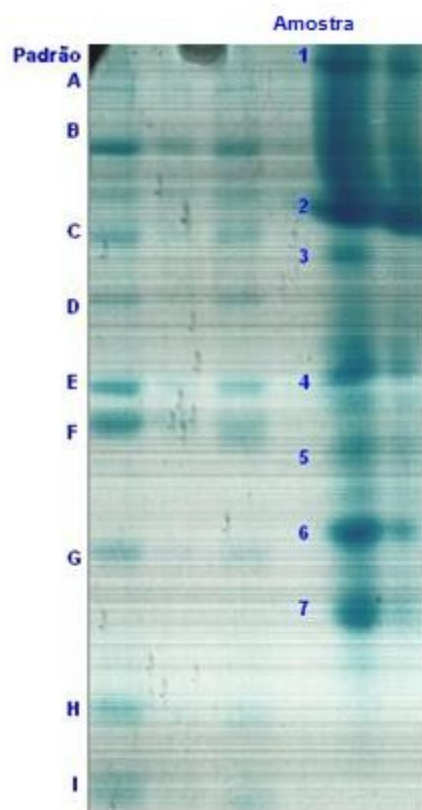


FIGURA 3. Proteinograma do leite de babaçu.

FONTE: Os autores

Existem poucos relatos na literatura à respeito de caracterização de proteínas de sementes ou amêndoas de frutos do cerrado. Para o babaçu não foram encontrados relatos na literatura sendo difícil comparar os dados obtidos neste estudo, porém podemos mencionar o estudo realizado por CARVALHO et al, 2006, onde são apresentados resultados de perfil eletroforético das proteínas de farinha e de isolado protéico de sementes de cupuaçu onde são relatados a presença de bandas protéicas com pesos moleculares variando entre 20,03 a 39, 79 KDa, onde proteínas (5, 6, e 7) com massas moleculares semelhantes foram obtidas neste trabalho. Além das três bandas observadas os autores também observaram seis bandas fracas que não foram identificadas devido, provavelmente, à impurezas presentes na amostra. Observado assim a grande dificuldade de se analisar proteínas contidas em matérias primas complexas, principalmente quando trabalhamos com uma matéria prima com grandes teores de gordura, como é o caso do babaçu (aproximadamente 30%).

Foi analisado a influência de concentrações de FFP e PEG, com diferentes massas molares (1500,4000 e 6000)Daltons sobre a relação de volume entre as fases formadas.

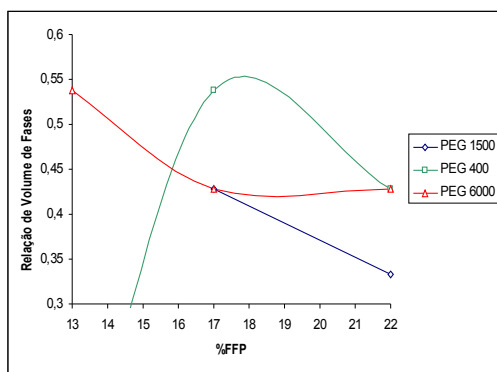


FIGURA 4. Efeito da concentração de FFP na relação de volume de fases para 10% PEG
FONTE: Os autores

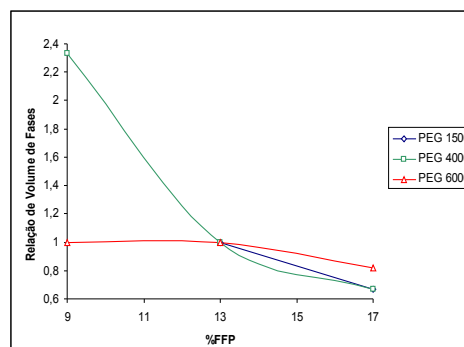


FIGURA 5. Efeito da concentração de FFP na relação de volume de fases para 14% PEG
FONTE: Os autores

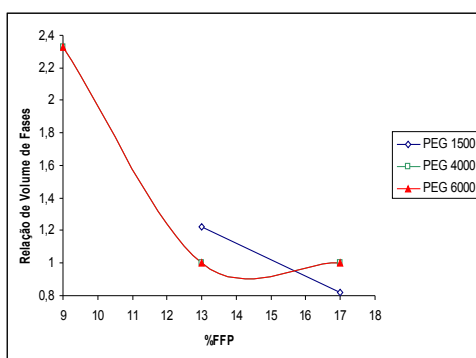


FIGURA 6. Efeito da concentração de FFP na relação de volume de fases para 18% PEG
FONTE: Os autores

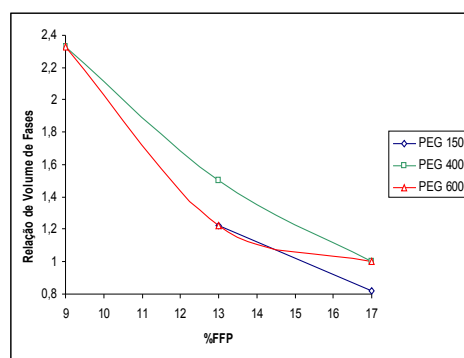


FIGURA 7. Efeito da concentração de FFP na relação de volume de fases para 20% PEG
FONTE: Os autores

Em todas as molaridades de PEG escolhidas houveram sistemas com uma proporção de fases distante da unidade, como pode-se observar nas Figuras 4, 5, 6 e 7. Esses sistemas foram então eliminados. Sistemas com PEG de massa molar de 4000 Daltons, a 14%, foram os que apresentaram melhor relação de volume de fases. Foram selecionados 14 sistemas, com as três molaridades de PEG (1500,4000 e 6000)Daltons para os experimentos de coeficiente de partição. Em estudo realizado por ZUÑIGA,2001, sistemas formados com PEG (4000,6000 e 8000) Daltons também apresentaram proporções de fases distantes da unidade. Empregando-se apenas PEG de massa molar 1500 Daltons nos experimentos de coeficiente de partição.

Uma relação de volumes entre as fases muito distante da unidade não inviabiliza o processo, mas leva ao descarte de uma grande quantidade de uma das fases em detrimento da outra, aumentando os custos do processo. (ZUÑIGA, 2001).

Os valores de coeficiente de partição para as proteínas do leite de babaçu obtidos com os SAB's selecionados, estão na Tabela 1.

Nos sistemas 4, 8, 9, 10 e 11, percebe-se que a maior parte das proteínas encontram-se na fase salina (baixo valor de K), enquanto que nos demais sistemas (1, 2, 3, 5, 7, 12, 13 e 14), grande parte das proteínas se transfere para a fase polimérica (maiores valores de K).

Em relação ao coeficiente de partição, Zuñiga, 2001, encontrou valores dos coeficientes de partição para a α -lactoalbumina e β -lactoglobulina. Praticamente toda a β -lactoglobulina permanece na fases salina, enquanto a α -lactoalbumina se transfere em grande parte para a fase polimérica, o que é um indicativo da viabilidade da separação destas proteínas por extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos, compostos por PEG e fosfato de potássio. (ZUÑIGA, 2001)

TABELA1. Efeito da massa molar e concentração do PEG e da concentração de FFP na partição.

PEG 1500			
Sistema	%PEG	%FFP	K
1	14	13	1,144
2	18	13	3,361
3	18	17	1,083
4	20	13	0,028
5	20	17	1,326
PEG 4000			
Sistema	%PEG	%FFP	K
6	14	13	0,171
7	14	17	1,3332
8	18	13	0,055
9	18	17	0,962
PEG 6000			
Sistema	%PEG	%FFP	K
10	14	9	0,021
11	14	13	0,024
12	18	13	2,458
13	18	17	3,327
14	20	17	1,615

Foi observado que, de uma forma geral, o coeficiente de partição diminui com o aumento da massa molar do PEG. Este fato também foi observado por outros pesquisadores.

Os sistemas nos quais as proteínas tiveram maior afinidade pela fase polimérica foram o 2, 12 e 13.

CONCLUSÕES

O leite de babaçu extraído das amêndoas apresentou um teor elevado de proteínas. A técnica de análise através do reagente de Biureto foi adequada para quantificar as proteínas presentes no leite de babaçu. Através do uso da técnica de eletroforese SDS-PAGE, foi possível a identificação de nove bandas do marcador de proteínas padrão e sete bandas de proteínas do leite de babaçu, podendo assim, ter uma estimativa das massas moleculares das respectivas proteínas. Apesar dos resultados obtidos, a técnica ainda deve ser melhorada para obtenção de dados mais precisos sobre a matéria – prima em estudo. O coeficiente de partição diminui com o aumento da massa molar do PEG. Os sistemas em que as proteínas tiveram maior afinidade com a fase polimérica foram: 2, 12 e 13.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 25-38, 1998.

ASAMI - ACADEMIA SUL-AMERICANA DE MEDICINA INTEGRADA. **Notícias**. Disponível em: <<http://www.asami.com.br/noticias/43-palestra-alimentacao-organica-e-seus-beneficios-para-a-saude-fisica-e-mental-de-criancas-e-gestantes.html>> Acesso em Julho de 2010.

BEZERRA, O.B. **Localização de postos de coleta para apoio ao escoamento de produtos extrativistas – um estudo de caso aplicado ao babaçu**. (Mestrado). UFSC. Agosto, 1995.

BRASIL. Ministério das Relações Exteriores. Disponível em: <<http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/divpol/nordeste/ma/babacu/index.htm>>. Acesso em Julho de 2010.

CARDARELLI, Haíssa Roberta; OLIVEIRA, Antonio Joaquim de. Conservation of Brazil nut extract. **Sci. agric.** , Piracicaba, v. 57, n. 4, 2000 .

COIMBRA, J.S.R. et AL,; **Uso de Sistema Aquoso Bifásico na Extração Líquido-Líquido**. Caderno Didático. Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa; p. 9-17, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970

LIRA, R.A. Avaliação das Proteínas do Extrato Solúvel (Leite) do Coco de Babaçu. TCC. UFT, 2006.

PINEDO, A. ; RIBEIRO, C. L. ; ALVIM, T. C ; GUEDES, E. C ; FERREIRA, D. S . Obtenção do extrato hidrossolúvel "leite" de babaçu (*Orbygnia speciosa*) em pó utilizando "Sprya dryer". In: XXI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos 2008, 2008, Belo Horizonte. Anais do CBCTA2008, 2008.

SOLER, Marcia Paisano; VITALI, Alfredo de Almeida; MUTO, Eric Fumhio. Babassu nut breaking technique. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** , Campinas, v. 27, n. 4, 2007 .

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**. N. 21, v. 6. 1998.

ZUÑIGA, A.D.G.; COIMBRA, J.S.R; MINIM, L.A. Coeficientes de partição da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos: influência da massa molar do polímero. **Ciencia y Tecnologia de Alimentos**, v.3, n.2, p. 149-155. 2001

ZUÑIGA, A.D.G.; COIMBRA, J.S.R; MINIM, L. A. ; ROJAS, E.G. Dispersed phase hold-up in a Graesser raining bucket contactor using aqueous two-phase systems. **Journal of Food Engineering**, v. 72, n. 03, p. 302-309, 2006