

Eucléia Primo Betioli Contel (**)

Friedhelm Marx (***)

Warwick Estevam Kerr (****)

RESUMO

Analisou-se separadamente amêndoas e embriões de cocos de babaçu, (*Orbignya martiana*) para estudar algumas de suas enzimas e vitaminas tendo em vista seu maior consumo na alimentação. Detetou-se sistematicamente duas frações proteicas fortemente coradas e uma que aparece em algumas amostras e não aparece em outras. Das enzimas constatou-se três leucino-aminoptidase málicas (MDH1, MDH2, MDH3) e duas desidrogenase do glicérol-3-fosfato (GPD). Quanto às vitaminas constatou-se existir em 100 gramas de material: no embrião 0.100mg de riboflovina, 3,4 de vit. C e 30 de alfa-tocoferol; a amêndoa tem pouco menos da metade das vitaminas B₁ e C.

INTRODUÇÃO

A palmeira babaçu, *Orbignya martiana* Barb. Rodr., não obstante ocupar extensa área do território nacional (Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Maranhão, Piauí) não tem sido convenientemente estudada quanto à composição química da sua castanha. Também, não há análises separadas do embrião.

Ventura & Lima (1958a) separaram 7 componentes na castanha total por meio de eletroforese de papel; um deles é uma glicoproteína que se precipita com 65-70% de $(NH_4)_2SO_4$. Ventura & Lima (1958b) examinaram as proteínas da castanha de babaçu por meio de ultracentrifugação. Vuyst et al. (1963) determinaram o conteúdo de proteína bruta e de 18 ácidos. Franke (1976) relata os ácidos graxos nos glicérides do óleo de babaçu: C_{6:0}=0,1%; C_{8:0}=6,5%; C_{10:0}=2,7%; C_{12:0}=45,8%; C_{14:0}=20,0%; C_{16:0}=7,0%; C_{18:1}=18,0%; C_{18:2}=traços. Com esta composição, o óleo da castanha de babaçu é bem semelhante ao de *Elaeis guineensis* Jacq. Ainda segundo Franke (1976), a castanha de babaçu contém 64-67% de óleo, 7 a

(*) Este trabalho recebeu auxílio do Banco do Brasil por meio de seu Fundo de Pesquisa Técnico Científica (FITEC).

(**) Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 14.049, Ribeirão Preto - SP.

(***) Rheimsche Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, I, Alemanha.

(****) Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, Largo dos Amores, 21, 65 000 - São Luís - MA.

10% de proteínas, 5% de amido, 5% de açúcares, 8% de fibra bruta, 2 a 3% de sais minerais.

Relataremos aqui nossos estudos preliminares, feitos nessa área, no que se refere à análise de proteínas totais, algumas isoenzimas e de três vitaminas.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Estudamos, separadamente, o embrião e o endosperma de amêndoas de cocos coletados de plantas situadas na Ilha de São Luís, Maranhão. Das plantas que forneceram cocos, 12 tinham inflorescências com poucas flores masculinas, e uma masculinóide, isto é, de cada 15 cachos de flores masculinas, produzia um com flores femininas; haviam ainda 3 plantas masculinas, porém sem cachos de cocos. Em resumo, neste trabalho usamos: (a) cocos de 4 plantas do km 12, Rodovia São Luís - São José de Ribamar; (b) 4 plantas do sítio do sr. Caracas; (c) 4 plantas do terreno do IPEM, em direção à ponte Bandeira Tríbuzi; (d) uma de Itapiracó, sítio do sr. Nelson Costa (a que chamamos de masculinóide).

MÉTODOS ELETROFORÉTICOS

Confecção do gel

Os primeiros testes foram feitos com embriões, cujos resultados foram nítidos, e com as amêndoas totais, com que não obtivemos resultados satisfatórios (coloriam fracamente). Partimos, por isso, apenas para análise dos embriões.

Foram analisadas as seguintes proteínas: totais (PT) leucina aminopeptidases (LAP), desidrogenase málica (MDH), desidrogenase do glicerol-3-fosfato (GPD) e superóxido dismutase (SOD).

Para a análise de PT e LAP, o gel de amido (Sigma) foi feito numa concentração de 10,5%, em tampão Tris-citrato (0,076M em Tris e 0,007M em ácido cítrico) numa faixa de pH variando de 8,4 a 8,6. Nas cubas, contendo os eletrodos, foi utilizado tampão borato 0,3 M, pH 8,0 (sistema de tampão adaptado de Poulik, 1957). A eletroforese durou cerca de 4 horas, à baixa temperatura ($\pm 10^{\circ}\text{C}$) aplicando-se 11V/cm de gel.

As desidrogenases e a SOD foram analisadas num sistema de tampões Tris-HCl, pH 7,5. A solução eletrolítica usada nas cubas foi feita numa concentração 0,3M, enquanto que o gel de amido (Sigma) foi feito nesse tampão 0,02 M. Para cada 100ml de gel acrescentamos 15mg de NAD após o cozimento e imediatamente antes de fazer o vácuo; 5ml do próprio tampão do gel foram utilizados para dissolver a coenzima (Smith et al., 1971).

A eletroforese, nesse caso, durou cerca de 18h, à $+ 10^{\circ}\text{C}$, com uma diferença de potencial de 40V entre os dois extremos do gel.

Deteção das proteínas após a eletroforese

A revelação de PT foi feita através de incubação do gel durante 30 minutos numa solução saturada de Amido Negro 10B em metanol: água: ácido acético (5:5:1, v/v). Em seguida, o gel foi levado na mesma solução acima, sem o corante, até a visualização das diferentes frações protéicas.

As isoenzimas da LAP foram reveladas incubando-se o gel a 37°C, numa mistura contendo: 10 ml de Tris-maleato 0,05M, pH 6,0; 25 mg de L-leucil-B-naftilamida (previamente dissolvidos em 0,5 ml de dimetilsulfóxido) e 50mg de sal Fast Garnet GBC (Scandalios, 1965).

MDH foi detectada após incubação do gel a 37°C, em contato com outro gel contendo: 15ml de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,6; 210mg de L-malato de sódio; 6mg de NAD; 0,9 ml de solução de MTT - metil-tiazolil tetrazólio - (5mg/ml de água destilada); 0,6 ml de solução de PMS - fenazina metassulfonada - (5 mg/ml de água destilada) e 15ml de agar a 2%, previamente fundido em água destilada (Harris & Hopkinson, 1976).

Isoenzimas de GPD foram observadas no gel com o emprego de: 15 ml de Tris-HCl 0,06 M, pH 8,0; 14mg de NAD; 440 mg de D-l-alfa-glicerofosfato de sódio; 0,7 ml de MTT, 0,7ml de PMS e 15 ml de agar (Harris & Hopkinson, 1976).

Nos géis corados com sal de tetrazólio aparecem regiões acromáticas contra o fundo corado de azul (que se intensificam à medida que o gel fica exposto à luz) as quais correspondem à enzima superóxido dismutase. Assim, foi possível analisar também a SOD.

Método para determinação de ácido ascórbico

A determinação de ácido ascórbico (AA) foi realizada por titulação com 2,4-diclorofenolindofenol e determinação biamperométrica do ponto final (Pfeilssticker & Marx, 1976, modificado).

10g de amostra foram bem triturados num misturador com 200 ml de ácido oxálico 2% em água; 50 ml do líquido leitoso foram colocados num recipiente em cima dum digitador magnético. A titulação foi feita com uma bureta automática (Metrohm). Para a determinação do ponto final usamos um eletrodo duplo de platina, entre os dois polos; foi aplicada uma tensão de 300mv. A corrente resultante fica bem baixa até todo o ácido ascórbico ficar oxidado. Após o ponto final a corrente é aumentada a cada adição de 2,4-diclorofenolindofenol. O título desta solução foi 0,20 mg de AA/ml. A figura 5 mostra a avaliação gráfica da titulação no caso de ácido ascórbico nos embriões.

Método para determinação de riboflavina

2,5g da amostra, bem triturada, foi pesada num balão aferido de 25 ml. Após a extração da gordura (tratamos 2 vezes com 20 ml de éter de petróleo) e decantamos o solvente, o resto foi tirado com um fluxo de nitrogênio. Em seguida, aquecemos num banho-maria vibratório com 20 ml de 0,1 M HCl por 30min, até 70°C. Depois de resfriar até 20°C completamos até 25 ml. Filtramos num filtro em pregas seco. Injetamos 20 µl num cromatógrafo líquido de alta pressão. A coluna de separação de 30cm de comprimento e de 4mm de diâmetro está cheia com a fase inversa ODS C₁₈ 10µm. A fase móvel é metanol/água = 4+6. A riboflavina é detectada com um fluorímetro, cujo comprimento de onda de excitação é 453nm e o de emissão é 520nm (Strohecher, 1966; Williams, 1977).

Método para determinação de alfa-tocoferol

5g de amostra foram bem trituradas com 100 ml de etanol frio (ca 5°C), adicionadas de 50 mg de butilhidroxianisol. Depois de transferir para um balão aferido de cor ambar de 500ml colocamos exatamente 20 ml de éter de petróleo. Depois de agitar em o balão, resfriar no congelador por cerca de 10 minutos, adicionar uma solução de NaCl a 1,5% até

que o nível de solução chegue no gargalo do balão, tira-se da fase orgânica para injetar no HPLC.

O sistema cromatográfico tem as seguintes características: coluna 30 cm de comprimento e 4mm de diâmetro, cheia com 10mm de Nucleosil 50-7. O alfa-tocoferol é detectado com um fluorímetro, comprimento de onda de excitação de 295nm e de emissão de 300 nm (Marx & Maia, 1983).

Na determinação de vitaminas nos embriões não foi possível usar as quantidades de amostra como descrito. Usamos somente 150mg de embriões para cada análise e diminuimos a quantidade dos solventes respectivos.

RESULTADOS

Proteínas e Ispenzimas

Para as cinco proteínas estudadas foi feito um total de 152 análises individuais de embriões das três localidades diferentes (todas na Ilha de São Luís), dando, portanto, um total de 760 análises. Nessa amostra e nas condições descritas neste trabalho, não detectamos a existência de polimorfismo genético bem caracterizado.

Conforme pode ser verificado na Figura 1, em relação à PT, detectamos sistematicamente 2 frações protéicas intensamente coradas (PT 2 e PT 3), uma fração mais anódica fracamente corada, mas que não apareceu em todas as análises (PT 1) e uma região que denominamos PT 4, constituída de pelo menos 3 frações protéicas, com mobilidades anódica, catódica e próxima à origem. Essa região apresentou variabilidade, mas como os componentes eletroforéticos aparecem fracamente corados no gel, não pudemos concluir se a variação observada é devida à segregação de alelos.

Duas enzimas de leucina aminopeptidases (LAP 1 e LAP 2) foram também consistentemente observadas nos 152 embriões analisados e não foi observada nenhuma variação (Figura 2).

As isoenzimas da desidrogenase málica constituem o sistema mais complexo, como pode ser observado pela Figura 3. Três regiões principais de atividade foram detectadas as quais denominamos MDH 1, MDH 2 e MDH 3. A isoenzima denominada MDH 2 é caracterizada por se corar intensamente (na maioria das análises) e ser detectada como uma zona bem delimitada e apresenta variabilidade que não nos parece ser de causa genética. É possível que MDH 1 seja uma isoenzima secundária de MDH 2 e, nesse caso, apenas um gene estaria envolvido na síntese de ambas, sendo MDH 1 um produto pós-tradução. A região que denominamos MDH é caracterizada por ter apresentado, em todas as análises, um perfil eletroforético complexo, constituído de no mínimo 3 regiões (Figura 3, amostra 2) e, maioria dos casos, por 5 regiões. Uma das causas do aparecimento de múltiplas bandas isoenzimáticas de maneira semelhante à mostrada na Figura 3, é a estocagem do material em baixa temperatura levando uma forma isoenzimática principal (o produto primário do gene) a apresentar-se como uma série de bandas, à medida que reage com alguma substância também presente no extrato estocado. Esse, estretanto, não foi o nosso caso, pois os embriões

eram retirados das amêndoas e imediatamente analisados. Uma explicação alternativa seria que o complexo de bandas fosse produto de polimerização de uma forma isoenzimica primária. Nesse caso, quando analisamos o material s̄o detectamos as formas poliméricas, pois nunca foi observado um embrião que apresentasse apenas uma fração isoenzimica na região que denominamos MDH 3.

A GPD (desidrogenase do glicérol-3-fosfato) apresentou sempre um padrão com uma zona bem intensa e outra anódica menos intensa, provavelmente uma isoenzima secundária. A superóxido dismutase apresentou sempre um perfil constituído por 5 zonas acromáticas, típico de um heterozigoto para uma enzima tetramérica (Figura 4).

Resultados das determinações de vitaminas

Na Tabela 1 encontram-se os resultados da determinação de vitaminas.

Tabela 1. Teor de vitaminas (mg/100g).

| | riboflavina | ácido ascórbico | alfa-tocoferol |
|---------|-------------|-----------------|----------------|
| Amêndoa | 0,047 | 1,4 | 32,6 |
| Embrião | 0,100 | 3,4 | 30,0 |

DISCUSSÃO

Devido a enorme abundância de babaçu no Maranhão e estados limítrofes, há uma grande necessidade de serem executadas pesquisas que transformem seu amido e castanha (em pães, biscoitos, farinhas e bebidas) e aparelhos que permitam uma rápida extração do seu óleo. Ao se encaminhar para a área da alimentação a primeira pergunta usualmente é: que vitaminas tem? Tem enzimas importantes? Qual sua riqueza mineral?

Este trabalho é o primeiro de uma série que pretende incrementar o uso da castanha e do amido do babaçu.

É interessante notar que as enzimas existem em quantidades desprezíveis nas amêndoas e em alta quantidade nos embriões. Isso sugere o desenvolvimento de máquinas que separem o embrião, para ser vendido a parte, como "germe de babaçu", a semelhança do germe de trigo.

Os teores de vitaminas hidrossolúveis (ácido ascórbico e riboflavina) são baixos, porém, são comparáveis aos de castanha-do-Pará (respectivamente: 0,7mg/100g e 0,035 mg/100g), mas duas vezes mais elevados nos embriões que nas amêndoas. O teor do alfa-tocoferol é alto, mas sem grande diferença entre embrião e castanha.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Srt^a Elisabeth Maria Barreto, pela assistência técnica nas Enzimas e vitaminas do ...

análises de vitaminas.

SUMMARY

Chemical analysis of nuts and embryo of babaçu (*Orbignya martiana*) were carried out. The amount of enzymes was quite small in the nuts but high in the embryos. The enzymes detected in this work are: two leucine-aminepeptidase, three malate dehydrogenases and two glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase. 100 grams of material the nuts had 0,047mg Riboflavin; 14mg Ascorbic acid and 32,6mg alpha-tocoferol. 100gr of embryo had 0,100mg of Riboflavin, 3,4 of ascorbic acid and 30,0mg of alpha-tocoferol.

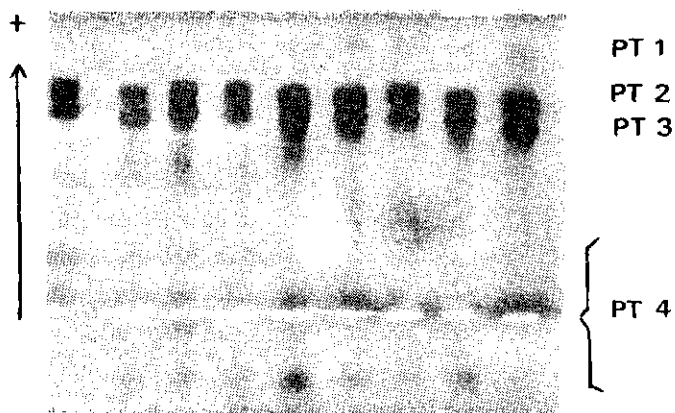


Fig. 1. Proteínas totais de embriões de babaçu coradas com Amido Negro, após eletroforese em pH 8,6. Migração no sentido indicado.

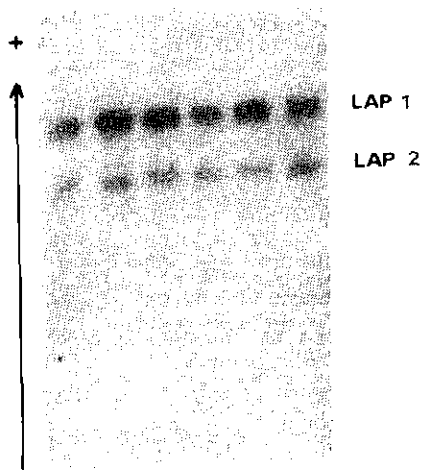


Fig. 2. Fotografia de um gel de amido feito em pH 8,6, mostrando as duas formas de leucina aminopeptidase de embriões de babaçu. Migração segundo a seta.

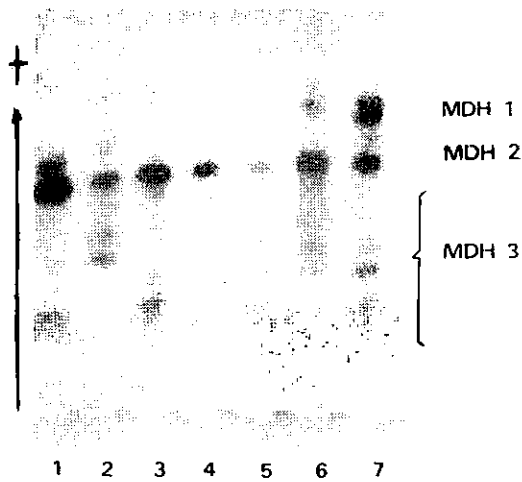


Fig. 3. Isoenzimas da desidrogenase málica de embriões de babaçu, reveladas em gel de amido em pH 7,5. Notar o perfil complexo da forma denominada MDH e que apresenta de 3 (amostra 2) a 5 componentes (demais amostras). A seta indica o sentido de migração.

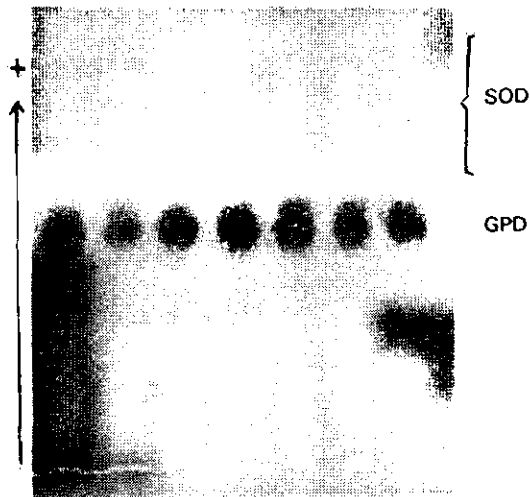


Fig. 4. Isoenzimas da superóxido dismutase e da desidrogenase do glicerol-3-fosfato de embriões de babaçu, reveladas em pH 7,5. Migração segundo a seta.

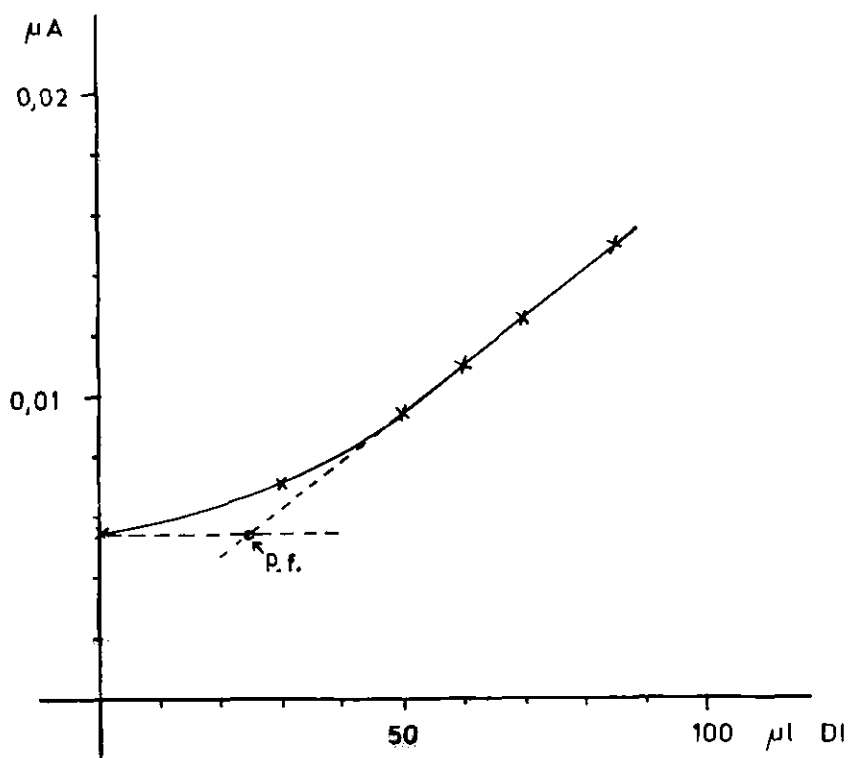


Fig. 5. Titulação **biampérométrica** do ácido ascórbico com 2,4 diclorofenolindofenol (DI) e determinação gráfica do ponto final (P.F.).

Referências bibliográficas

- Franke, W. - 1976. **Nutzpflanzenkunde**. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Harris, H. & Hopkinson, D. A. - 1976. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics**. North-Holland.
- Marx, F. & Maia, J. G. S. - 1983. Vitamins in fruits and vegetables of the Amazon. Methods for the determination of beta-carotene, tocopherol and ascorbic acid with high performance liquid chromatography (HPLC). **Acta Amazonica**, 13(5-6): 823-830.
- Pfeilsticker, K. & Marx, F. - 1976. **Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Mehl durch biamperometrische Titration**. Getreide, Mehl und Brot. p. 282-283.
- Poulik, M. D. - 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. **Nature**, 180: 1477-1490.
- Scandalios, J. G. - 1965. Leucine Aminopeptidase isozymes in maize development. **J. Hered.**, 56: 177-180.
- Smith, M.; Hopkinson, D. A.; Harris, H. - 1971. Development changes and polymorphisms in human alcohol dehydrogenase. **Ann. Hum. Genet.**, 34: 251-271.
- Strohecker, R. & Hening, H. M. - 1966. **Vitamin assay, tested methods**. Alemanha, Verlag, Chemie Weinheim.
- Ventura, M. M. & Lima, J. H. - 1958a. Proteins of babassu kernel. III. Study by paper electrophoresis, (Buenos Aires). **Phytoh**, 11: 15-21.
- - 1958b. Babassu kernel proteins. IV. Ultracentrifugal examination, (Buenos Aires). **Phytoh**, 11: 115-116.
- de Vuyst, A.; Verwack, W.; van Belle, M.; Arnould, R.; Moreels, A. - 1963. Les acides amines des tourteaux. (Louvain). **Agricultura**, 11: 385-390.

(Aceito para publicação em 08.07.1986)