

Extração de Proteína Total e Atividade Antioxidante de Torta de Filtro de Cana-de-Açúcar

Luciana Maria Liboni Passos, Juliana Aparecida de Souza-Sartori, Roberta Bergamin-Lima, Talita Nicola Zocca, Antonio Sampaio Baptista, Claudio Lima de Aguiar

Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Grupo de Pesquisa Hugot-Bioenergia, Piracicaba, SP - E-mail: claguiar@usp.br

Submetido em 19/07/2013; versão revisada em 11/11/2013; aceito em 18/11/2013

RESUMO

Empregou-se a torta de filtro como fertilizante para colheitas, mas outras alternativas também foram exploradas como a possibilidade de extração de proteínas de interesse econômico e de compostos com atividade antioxidante. Observou-se que o melhor rendimento em proteínas foi obtido em pH alcalino e uma razão molar abaixo de 0,15. A elevação da temperatura aumentou a extração das proteínas. Na caracterização da atividade antioxidante, o fator temperatura não foi relevante, os principais fatores foram a razão molar (maior que 0,15) e o pH (alcalino). Não foi possível otimizar a extração de proteínas e dos antioxidantes da torta de filtro usando o modelo linear.

Palavras-chave: torta de filtro; proteína; antioxidante

ABSTRACT

Filter cake has been done as fertilizer on crops, but other alternatives have been explored such as the possibility of extracting valorous proteins and compounds with antioxidant activity. It was observed that quantities of proteins were obtained at alkaline pH and molar ratio lower than 0.15. The improvement of the temperature, promotes the amount of protein was extracted. In analysis of the antioxidant activity, the temperature factor was not relevant, the main factors to be observed molar ratio (more than 0.15) and pH (alkaline). Unable to optimize the extraction of proteins and antioxidants filter cake with the linear model used.

Keywords: Filter cake, protein, antioxidants

INTRODUÇÃO

A partir da cana-de-açúcar é possível produzir uma infinidade de produtos como: açúcar, álcool potável e/ou combustível, cachaça, variedades forrageiras, produção de garapa ou caldo de cana servido imediatamente após a moagem.¹

O Brasil é o país que tem apresentado forte crescimento na produção de cana-de-açúcar, últimas duas safras, com quase 570 milhões de toneladas produzidas na safra 2012/2013.² Com o esperado aumento de produção é de se esperar que haja um gradual aumento na produção de torta de filtro, um dos resíduos gerados na produção de álcool e açúcar, uma vez

que o volume de produção é da ordem de 2,5 a 3,5% do volume de cana-de-açúcar processada, e apresenta elevada umidade, teor de matéria orgânica, fósforo, cálcio, magnésio e nitrogênio.³

A torta de filtro é muito utilizada na fertilização dos canaviais⁴, mas para tanto, é necessário que se adicionem outros nutrientes, uma vez que somente ela não é suficiente para o completo desenvolvimento das plantas. Além disso existe o aspecto ambiental, já que estudos apontam um aumento na concentração de metais pesados em solos que tradicionalmente recebem tratamentos culturais a base de torta de filtro, e um potencial risco de contaminação do lençol freático uma vez que

Tabela 2. Planejamento fatorial completo 2³ e a média da quantidade de proteína extraída

9	ó و	ó و	ó و	Çs	°C	w	t
و	1	1	1	ی	ی	ی	ی
و	و	1	1	ی	ی	ی	ی
ی	1	و	1	ی	ی	ی	ی
ی	و	و	1	ی	ی	ی	ی
ی	1	1	و	ی	ی	ی	ی
ی	و	1	و	ی	ی	ی	ی
ی	1	و	و	ی	ی	ی	ی
ی	و	و	و	ی	ی	ی	ی
لا	ی	ی	ی	ی	ی	ی	ی
ی	ی	ی	ی	ی	ی	ی	ی
و	ی	ی	ی	ی	ی	ی	ی
و	ی	ی	ی	ی	ی	ی	ی

Análise de proteína total do extrato obtido

Para determinação do teor de proteínas totais do extrato por Kjeldahl, primeiro realizou-se a digestão da amostra, colocando em tubo do tipo Bucchi, 10 mL de ácido sulfúrico p.a. densidade 1,84 g/mL (Merck, São Paulo, SP), 2 g de catalisador (composta de mistura na proporção de 10/1 de sulfato de potássio p.a. e sulfato de cobre pentahidratado p.a.) e 0,1 g do extrato protéico.

O tubo foi colocado em bloco digestor por aproximadamente 4 horas. As amostras digeridas foram acopladas no destilador de nitrogênio Bucchi, onde ocorre a liberação do nitrogênio da amostra para uma solução de ácido bórico 4%, permitindo a formação de borato de amônio (caráter básico), que posteriormente foi titulado com ácido clorídrico 0,1 N.

Análise de antioxidantes

O método fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) ocorrida em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695 nm.¹⁴

O complexo fosfomolibdênico é formado pela reação da solução de Na₃PO₄ (28 mL, 100 mM) com solução de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4 H₂O (12 mL, 30 mM) e solução de H₂SO₄ (20 mL, 3 M), em meio aquoso, sendo o volume final ajustado com H₂O destilada para 100 mL.

Os resultados são expressos em AAR% (ácido ascórbico), após cálculo a partir da expressão:

$$AAR\% (\text{ácido ascórbico}) = [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) / (A_{\text{ácido ascórbico}} - A_{\text{branco}})] \times 100$$

onde, AAR%(ácido ascórbico) é a atividade antioxidante relativa, expressa em porcentagem; Aamostra é a absorbância da amostra testada; Abranco é a absorbância do branco preparada com água deionizada; Aácido ascórbico é a absorbância da solução referência a uma concentração de 200 g/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração de proteína

Os resultados obtidos para as diferentes condições estão descritos na Tabela 2. A análise da variância dos resultados pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3. Análise da variância

	SQ	GL	MQ	Teste f
Regressão	0,8499	5	0,1700	6,0566*
Resíduo	0,1684	6	0,0281	-
Falta de ajuste	0,1675	3	0,0558	191,4476*
Erro puro	0,0009	3	0,0003	-
Total	1,0183	11	-	-

R² = 0,8346; SQ= Soma quadrática;

GL= Grau de liberdade;

MQ=Média Quadrática

O modelo de regressão gerado foi significativo porque o F calculado (= 6,0566) foi maior que o F tabelado (= 4,39). Porém, a falta de ajuste também foi significativa, uma vez que o valor de F calculado (= 191,44) foi maior que do F tabelado (= 9,28). Essa falta de ajuste pode ser justificada pelos valores muito baixos do erro puro e as médias nos pontos centrais terem sido muito próximas,

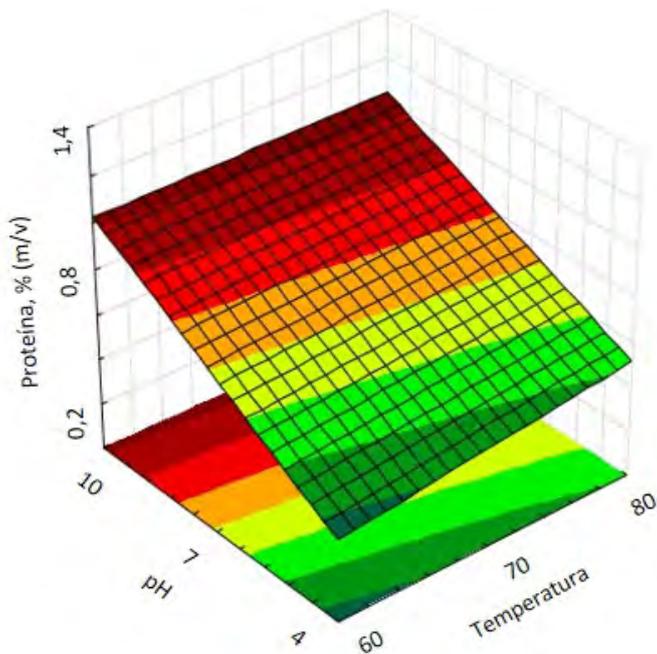


Figura 1. Superfície de resposta para extração de proteína de torta de filtro em função das variáveis pH e temperatura

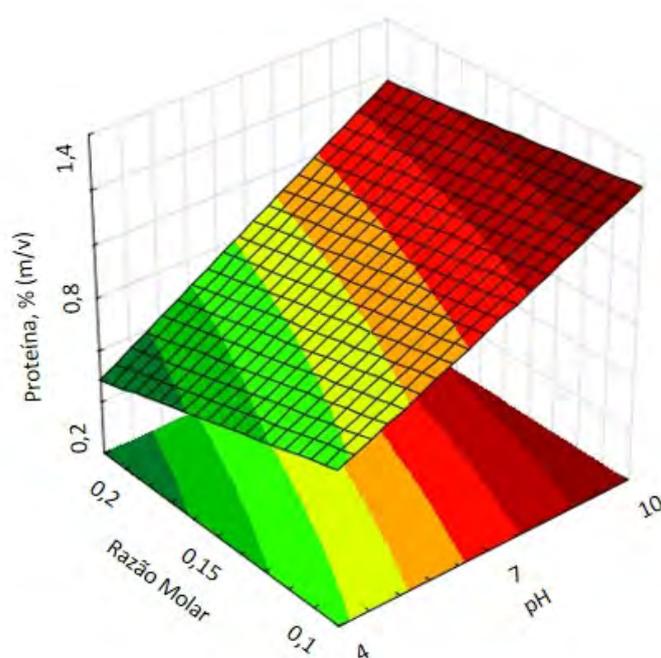


Figura 2. Superfície de resposta para extração de proteína de torta de filtro em função das variáveis pH e razão molar (m/v)

sendo assim o modelo considerado válido. A proximidade da média nos pontos centrais pode ser observada na Figura 1.

Ao analisar os efeitos, pode se perceber que o pH (0,60) tem maior influência na extração de proteína quando comparado à temperatura (0,09), e que a razão molar (-0,215) apresenta efeito negativo, ou seja, com o aumento do seu valor diminui a quantidade extraída.

Segundo Barros Neto, Scarminio e Bruns (1995; 2001); Khuri e Cornell (1996), citado por Souza e Menezes (2008), o coeficiente de determinação (R^2) indica a proporção da variação total da resposta que é explicada pelo modelo. Ou seja, quanto maior o R^2 (mais próximo de 1), menor será o erro e melhor o modelo. Ainda, de acordo com esses autores, os modelos com $R^2 < 0,60$ devem ser usados somente como indicadores de tendência, nunca para fins preditivos. O coeficiente de determinação de regressão ($R^2 = 0,8346$) para o modelo foi válido, indicando que ele explica 83,46% da variação dos dados observados. A equação que representa o modelo pode ser observada abaixo:

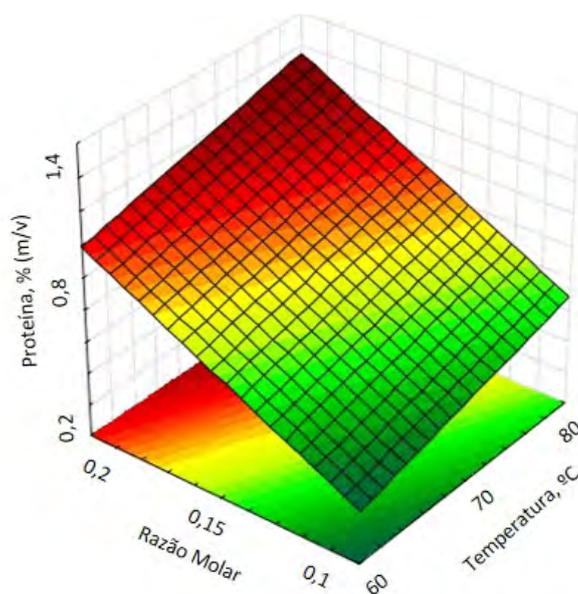


Figura 3. Superfície de resposta para extração de proteína de torta de filtro em função das variáveis temperatura e razão molar (m/v)

obtidos em pH acima de 7,0, ou seja, em pH básico. Houve um aumento gradativo da quantidade de proteína extraída na medida em que temperatura aumentou. Na figura 2, pode-se observar que os maiores valores de proteína extraídos foram em pH acima de 7,0. Assim como, as maiores quantidades de proteína foram extraídas em concentrações de soluto menores que 0,15. Com relação a razão molar e temperatura, é mostrado na figura 3 que maiores

$$\% \text{ Proteína} = 0,7333 + 0,043621 * \text{Temp} + 0,211597 * \text{pH} - 0,077803 * \text{RM} - 0,0325 * \text{Interação (Temp x pH)} + 0,04 * \text{Interação (pH x RM)}$$

Pela análise de superfície de resposta pode-se observar que a quantidade de proteína extraída foi influenciada pelos fatores estudados com diferente intensidade. Na figura 1, observa-se que os maiores valores de proteína extraídos foram

í MNÑVÇBÍ ÕVÑÓÓ ÑPÖ MPOÄMÑÓ ÖPÖC e a média da atividade antioxidante em % de ácido ascórbico

Ensaio	X1	X2	X3	Temperatura, °C	pH	Razão molar	Atividade Antioxidante relativa, %
و	□	□	□	هـ	ى	هـ □	ولا
و	□	□	□	هـ	ى	هـ □	هـ
ى	□	□	□	هـ	هـ	هـ □	لا
ى	□	□	□	هـ	هـ	هـ □	هـ
ي	□	□	□	هـ	ى	هـ □	لاي
ي	□	□	□	هـ	ى	هـ □	لاي
ي	□	□	□	هـ	هـ	هـ □	لا
ي	□	□	□	هـ	هـ	هـ □	يلا
لا	هـ	هـ	هـ	هـ	ي	هـ □	ىو
هـ	هـ	هـ	هـ	هـ	ي	هـ □	يىو
وو	هـ	هـ	هـ	هـ	ي	هـ □	ووو
وو	هـ	هـ	هـ	هـ	ي	هـ □	هـوو

quantidades de proteína foram extraídas nas condições de razão molar menor que 0,15 e temperatura maiores que 70°C.

Extração de compostos antioxidantes

Os resultados obtidos para as diferentes condições estão descritos na Tabela 4. A análise da variância dos resultados pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 5. Análise da variância

	SQ	GL	MQ	Teste f
Regressão	16214,500	3	5404,833	23,0924**
Resíduo	1872,416	8	234,052	
Falta de ajuste	1815,67	5	363,133	19,196*
Erro puro	56,75	3	18,916	
Total	18086,92	11		

R² = 0,89648; SQ= Soma quadrática; GL= Grau de liberdade; MQ=Média Quadrática

A figura 4 apresenta equação da reta com valor de R² = 0,89648 e valor e erro puro de 18,91667, sendo o F calculado (23,09) considerado significativo e preditivo, por ser três vezes superior ao valor de F tabelado (4,07), e a falta de ajuste significativa, pois possui valor de F calculado (19,19) superior ao valor de F tabelado (9,01).

Na interpretação da figura 4, pode-se observar que o fator “Razão Molar” teve um comportamento mais

pronunciado para a resposta AAR% quando comparado ao efeito do fator pH, pois imprime maiores valores à Atividade Antioxidante Relativa à solução padrão de Ácido Ascórbico (200 µg/mL), e por conseguinte, maior atividade antioxidante “in vitro”. Esse fato pode ser descrito por um maior teor de compostos químicos ativos presentes nos extratos testados, conforme pode-se verificar na figura 5.

Figura 4. Superfície de resposta para extração de compostos antioxidantes de torta de filtro em função das variáveis razão molar (m/v) e pH

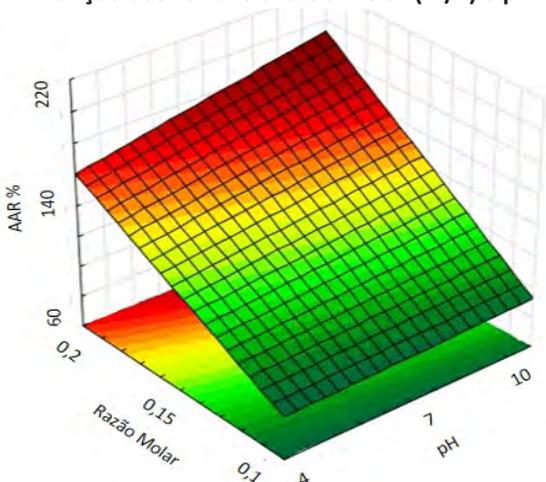
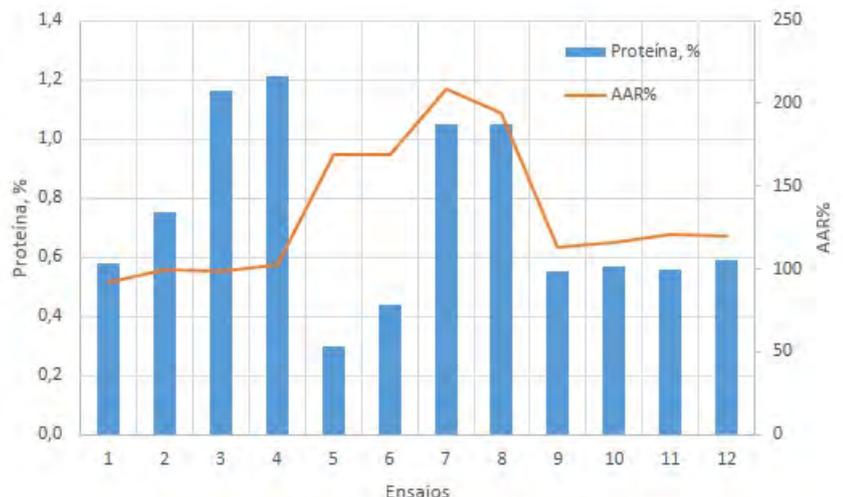


Figura 5. Correlação entre teores de proteína total (Kjeldahl) extraídas e capacidade antioxidante total “in vitro”



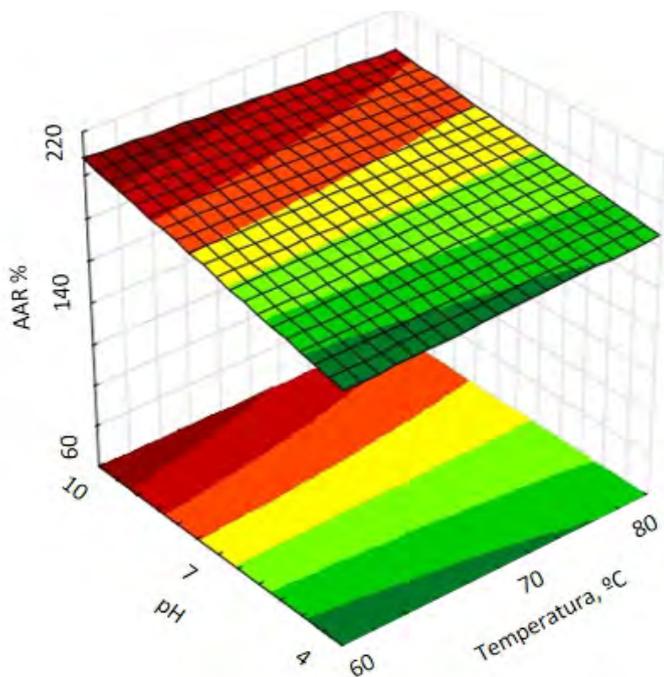


Figura 6. Superfície de resposta para extração de compostos antioxidantes de torta de filtro em função das variáveis temperatura e pH

Muito embora os Ensaios 3, 4, 7 e 8 apresentaram maiores teores de proteínas após o processo de extração aquosa, não foi percebido qualquer correlação entre o aumento nos teores de proteínas e a atividade antioxidante “in vitro”, demonstrando que a atividade antioxidante pode estar relacionada a outros compostos ativos presentes nos extratos que não tenham sido analisados.

O fator Temperatura não apresentou interação com os fatores de Razão Molar e pH, sendo assim desconsiderado na formulação da equação de representação do modelo descrita abaixo. A equação que representa o modelo para extração de compostos com atividade antioxidante a partir de torta de filtro do processamento de cana-de-açúcar está descrito a seguir, como função apenas da razão molar entre a torta de filtro/água deionizada, bem como, do pH da solução aquosa durante o processo extrativo.

$$\text{Atividade}_{\text{ác ascórbico}} =$$

$$133,4167 + 9,25 \cdot \text{pH} + 43,500 \cdot \text{RM} + 7 \cdot \text{interação (pH x RM)}$$

Pelas Figuras 6 e 7 foi possível observar a não influência, pelas condições testadas, da temperatura na análise de atividade antioxidante.

A atividade antioxidante representada em percentual de ácido ascórbico na Figura 6 cresce com

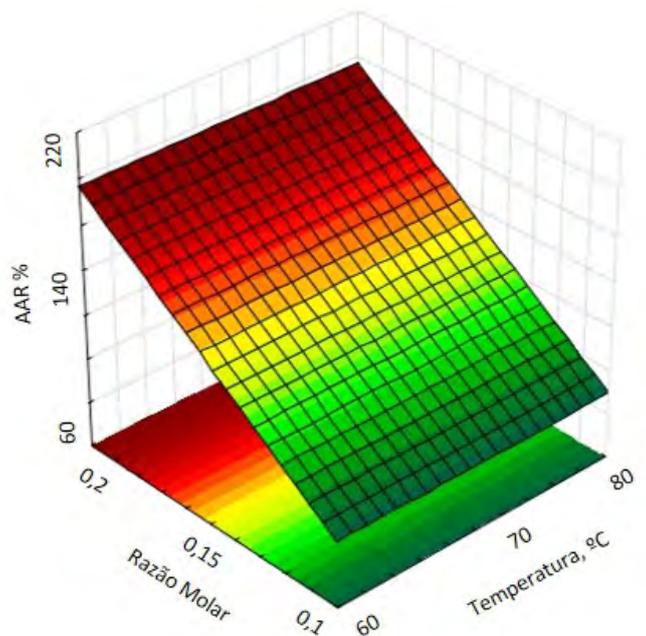


Figura 7. Superfície de resposta para extração de compostos antioxidantes de torta de filtro em função das variáveis razão molar (m/v) e temperatura

aumento do pH, sem que a alteração de temperatura interfira na elevação da atividade antioxidante; sendo que o mesmo comportamento pode ser observado na Figura 7, quando há incremento da atividade antioxidante apenas em função do aumento da razão molar, ou seja, quanto maior a quantidade de torta de filtro utilizada nos processos extrativos, maior foi a atividade antioxidante. A atividade antioxidante representada em percentual de ácido ascórbico na Figura cresce proporcionalmente à elevação do valor da razão molar, sem que a alteração de temperatura interfira no aumento da atividade antioxidante (Figura 7).

CONCLUSÕES

Pode-se considerar que a temperatura teve influência com aumento da quantidade extraída de proteína total (Kjeldahl) nos valores estudados (60 a 80°C) e que as condições de pH básico e menor razão molar apresentaram maiores quantidades de proteína extraída. Não foi possível otimizar a extração de proteínas da torta de filtro, visto que o modelo matemático resultante foi linear e, desta forma, não caracterizando um modelo polinomial com caracterização do ponto de máximo (ponto ótimo). Por outro lado, quanto à atividade antioxidante do extrato de torta de filtro, a temperatura

não teve influência, sendo a razão molar seguida de uma influência sutil do pH, os principais fatores a influenciar a atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Braz, H. Garapa boa deve vir de cana apropriada. O Estado de São Paulo, São Paulo, 27 Ago. 2003. Suplemento Agrícola, p. 1-3.
- ÚNICA. 2012. Disponível em: <http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica>. Acesso em: Outubro 2012.
- EMBRAPA. 2012. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_39_711200516717.html. Acesso em: Outubro 2012.
- Leme, Jr.; Borges, J.M. *Açúcar de cana*. Imprensa Universitária: Viçosa, 1965.
- Lutz, H.; Esuoso, K.; Kutubuddin, M.; Bayer, E. *Biomass and Bioenergy*, 1998, 15, 2.
- Paturau, J. M. *By-products of the Cane Sugar Industry*. New York: Elsevier Publishing Company, 1969.
- Meunchang, S.; Panichsacpatana, S.; Weaver, R.W. *Bioresource Technology*, 2005, 96.
- Ramalho, J.F.; Amaral Sobrinho, N.M. (2001). *Revista Floresta e Ambiente*, 2001, 8, 1.
- Vieira, T. M. F. S. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003.
- García, A. G.; Rodriguez, G. B.; Tio, M. V. Em: *Manual dos derivados de cana-de-açúcar (ICIDCA)*. Brasília: ABIPTI, 1999.
- Laguna Granja, A.; Hernández, M.; Quintana, D. C.; Valmana, L. A.; Ferreiro, R. M.; Mesa, M. G. *U. S. Patent 5.663.156*, 1997.
- Laguna Granja, A.; Hernández, M.; Quintana, D. C.; Valmana, L. A.; Ferreiro, R. M.; Mesa, M. G. *U. S. Patent 5.856.316*, 1999.
- Bravo, L. G.; Hernandez, J. M.; Gonzalez, P. C. A.; Souto, N. P. *J. of Chromatography B*, 1996, 682.
- Botega, D. C. Z.; Barrera-Arellano, D. *Resumos do XIV Congresso de Iniciação Científica - Unicamp*, Campinas, Brasil, 2006.
- Payet B, Cheong AS, Smadja J. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53.
- Smith, P.; Paton, N.H. *Sugar Technology Review*, 1985, 12.
- Palla, G. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 1982, 30.
- Takara K, Ushijima K, Wada K, et al. *J. of Oleo Science*, 2007, 56, 11.
- Fuhrman, B.; Aviram, M. Em: *Handbook of Antioxidants*; Cadenas, E., Packer, L., Eds.; Dekker: New York, 2002; pp 167-187.
- Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. *Analytical Biochemistry*, 1999, 269.



Simpósio Nacional de Biocombustíveis

23 a 25 de abril de 2014
Trabalhos: 2 de março
Cuiabá - Mato Grosso

