

Extração e caracterização parcial do inibidor de tripsina/quimotripsina de sementes de quinoa (*Chenopodium quinoa*)

POMPEU, L.G.¹; POMPEU, D. G.¹; OLIVEIRA, A.C. ¹; RAMOS, A.S.¹; PARREIRA. A.G. ¹; GONÇALVES, D.B.¹; GRANJEIRO, J.M.², SILVA, J.A. ¹; GRANJEIRO, P.A. ¹

RESUMO

A quinoa (*Chenopodium quinoa*) é uma planta da família *Chenopodiaceae*, cultivada em diferentes regiões na América do Sul. Um inibidor de tripsina de sementes da quinoa foi extraído e caracterizado. O melhor meio de extração foi obtido pela agitação da farinha da quinoa em NaCl 0,1M. Para a recuperação do inibidor de tripsina, o tempo de extração adequado foi de 5h (0,53±0,017). Após a caracterização o extrato bruto foi aquecido em diferentes temperaturas (60, 70, 90, 100°C). Atividade inibitória é maior no tratamento a 60°C. Nos estudos de estabilidade o inibidor manteve a atividade inibitória em ampla faixa de pH (pH 2–12) e a atividade inibitória apresentou uma pequena redução gradual com o aumento de temperatura (20–100°C) mas não apresentou pontos com total perda da atividade. Na presença de DTT, apenas na concentração de 1µM não ocorreu a perda da capacidade inibitória nos intervalos de tempo predeterminados.

Palavras-chave: *Chenopodium quinoa*, semente, inibidor de protease, extração, caracterização, tripsina.

INTRODUÇÃO

Chenopodium quinoa Willd é um pseudocereal que tem sido cultivado na região andina por milhares de anos. É uma planta perene que possui cerca de 1 a 2m de altura e raízes profundas e penetrantes. *C. quinoa* pode ser cultivada do nível do mar até uma altitude de 3800m, sendo

mais encontrada entre as altitudes de 2400 e 3800m. A planta apresenta tolerância a frio, salinidade e escassez de nutrientes e tem a habilidade de crescer em solos marginais. O grão da quinoa é altamente nutritivo devido sua qualidade excepcional de proteínas e seu amplo espectro de vitaminas e minerais. A proteína da sua semente é rica em aminoácidos como a lisina e a metionina que são comumente deficientes em outros cereais. A habilidade da quinoa em produzir grãos com alto teor proteico mesmo em condições ecologicamente extremas faz dela importante para a diversificação de futuros sistemas agrícolas, especialmente em áreas de altitudes elevadas¹.

Os inibidores são moléculas proteicas capazes de associar com proteases de modo competitivo, promovendo perda de todas as funções catalíticas das enzimas. No sítio ativo, composto por uma pequena sequência de resíduos de aminoácidos, há um domínio formado a partir de uma ponte dissulfeto. A interação inibidor/protease se dá através de numerosas interações resultando em um ajuste excelente^{2,3}. Estudos adicionais sobre a distribuição precisa e ação dos inibidores de proteinases são ainda necessários para confirmar os mecanismos pelos quais os inibidores atuam.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *Chenopodium quinoa* foram moídas e peneiradas para se obter uma farinha fina, a qual foi submetida à extração. Diferentes soluções foram testadas para a extração sendo: água destilada; NaCl 0,10M; NaCl 0,15M; NaCl 0,30M; NaOH 0,01M e NaCl 0,02M e em diferentes tempos (1, 2, 3, 4 e 5 horas). O efeito da temperatura sobre a recuperação da atividade do inibidor de tripsina foi testado pelo aquecimento às temperaturas de 60, 70, 80, 90 e 100°C. As extrações foram feitas sempre na proporção de 1:5(p/v) de farinha de semente para meio de extração, sob agitação branda constante. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 3.600rpm durante 30min. O sobrenadante foi separado e dialisado contra água

¹ Laboratório de Química de Proteína, UFSJ - Universidade Federal de São João Del Rey, Departamento de Bioquímica, MG, Brasil. E-mail: liviogpompou@hotmail.com (responsável pelo contato e correções)

² Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Av. Nossa Senhora das Graças, 50 – Xerém Duque de Caxias - RJ - Brasil - CEP: 25250-020.

destilada. Após diálise o material foi liofilizado, obtendo o Extrato Bruto (EB) e estocado a -20°C até o uso posterior. Após determinar as melhores condições para extração, o inibidor obtido foi testado para a sua estabilidade a diferentes valores de pH (pH 2-12), diferentes temperaturas ($20-100^{\circ}\text{C}$) e para a presença de diferentes concentrações de DTT (0,1, 10 e $100\mu\text{M}$). A atividade de enzimas do tipo tripsina foi determinada pela hidrólise do substrato específico BApNA (N- α Benzoyl-D-L-Arginine p-Nitroanilide). Após a adição do substrato a reação ocorreu por 20 minutos a 37°C e posteriormente foi parada com a adição de ácido acético (30%, v/v). A absorbância resultante foi determinada a 405nm e a atividade inibitória foi determinada em unidades/mg proteína. Esse experimento foi realizado em triplicatas com seus apropriados brancos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1: Efeito de diferentes meios de extração sobre a recuperação de inibidor de tripsina de sementes de *Chenopodium quinoa*. A média \pm DP de determinações em triplicata.

Meio de extração	Inibidor de tripsina (Unidades/ g proteína)	Proteína (mg /g proteína)	Atividade específica (Unidades/ mg proteína)
Água destilada	1.03 ± 0.028	14.94 ± 0.098	0.83 ± 0.0069
NaCl 0.30 M	0.92 ± 0.0090	14.84 ± 0.025	0.74 ± 0.0019
NaCl 0.15 M	0.55 ± 0.0046	14.58 ± 0.039	0.43 ± 0.0028
NaOH 0.02 M	0.64 ± 0.017	15.64 ± 0.049	0.47 ± 0.0040
NaOH 0.01 M	0.87 ± 0.0076	17.79 ± 0.019	0.56 ± 0.0015
NaCl 0.1M	1.03 ± 0.019	11.97 ± 0.053	0.90 ± 0.0036

O melhor meio de extração foi obtido por agitação da farinha de sementes de quinoa no tampão NaCl 0,1M com atividade específica de $0,9 \pm 0,0036$ unidades/mg de proteína. O segundo melhor meio foi a água destilada, com $0,83 \pm 0,0069$ unidades/mg de proteína seguido por NaCl 0,3M com $0,74 \pm 0,0019$ unidades/mg de proteína. Os demais meios apresentaram relação inferior a 0,60 unidades/mg de proteína. Vale ressaltar que apesar de alguns meio apresentarem um alto valor de proteínas totais

extraídas, a baixa presença do inibidor expressa em unidades/g de proteína, resulta em um valor de atividade específica insatisfatório, conforme tabela 1.

Tabela 2: Efeito de diferentes tempos de extração em NaCl 0,1M sobre a recuperação de inibidor de tripsina de sementes de *Chenopodium quinoa*. A média \pm DP de determinações em triplicata.

Tempo (h)	Inibidor de tripsina (Unidades/ g proteína)	Proteína (mg /g proteína)	Atividade específica (Unidades/ mg proteína)
1	$0,072 \pm 0,005$	$2,68 \pm 0,027$	$0,078 \pm 0,026$
2	$0,240 \pm 0,002$	$3,03 \pm 0,005$	$0,241 \pm 0,002$
3	$0,460 \pm 0,051$	$2,65 \pm 0,004$	$0,304 \pm 0,063$
4	$0,460 \pm 0,017$	$2,90 \pm 0,016$	$0,443 \pm 0,014$
5	$0,590 \pm 0,028$	$3,18 \pm 0,013$	$0,534 \pm 0,017$

Para a recuperação ótima do inibidor de tripsina, o tempo de extração mais adequado foi obtido em um período de 5 horas, com valor de atividade específica de $0,53 \pm 0,017$ unidades/mg de proteína, demonstrado na tabela 2. Os demais períodos de tempo apresentaram menores quantidades do inibidor de tripsina e quantidades de proteínas totais variadas resultando em valores de atividade específica abaixo de 0,50 unidades/mg de proteína.

Tabela 3: Efeito de diferentes temperatura de extração em NaCl 0,1M sobre a recuperação de inibidor de tripsina de sementes de *Chenopodium quinoa*. A média \pm DP de determinações em triplicata.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Inibidor de tripsina (Unidades/ g proteína)	Proteína (mg /g proteína)	Atividade específica (Unidades/ mg proteína)
60	$0,36 \pm 0,022$	$2,96 \pm 0,043$	$0,625 \pm 0,019$
70	$0,29 \pm 0,023$	$2,68 \pm 0,050$	$0,559 \pm 0,024$
80	$0,049 \pm 0,006$	$2,34 \pm 0,048$	$0,109 \pm 0,032$
90	0	$2,22 \pm 0,003$	0
100	0	$2,00 \pm 0,013$	0

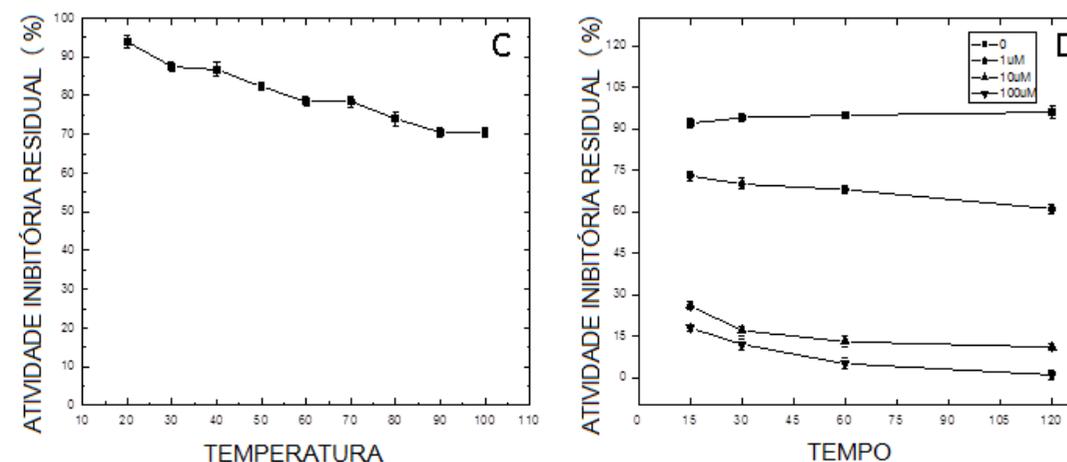
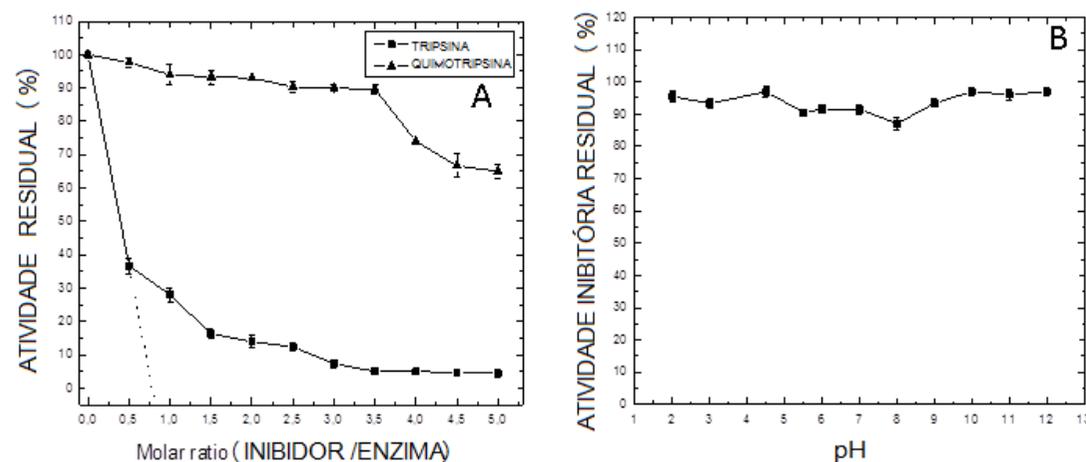
O extrato em bruto obtido foi incubado a diferentes temperaturas (60, 70, 90, 100 $^{\circ}\text{C}$). A atividade mais elevada de inibição de tripsina foi

apresentada sob o tratamento térmico de 60°C com $0,625 \pm 0,019$ com perda gradual da atividade nas temperaturas mais elevadas chegando à total perda em 90 e 100°C, conforme tabela 3.

Com o inibidor de protease purificado obteve-se a curva de inibição para as enzimas tripsina e quimotripsina demonstrada no gráfico permitindo a projeção da tangente da curva para a estimativa do valor de molar ratio (figura 1-A) Também é possível observar nesse gráfico a maior atividade do inibidor contra a tripsina que a quimotripsina.

A inferência nos estudos de estabilidade demonstraram que o inibidor retém a atividade inibidora sobre uma ampla faixa, que varia de pH 2 ao pH 12 (gráfico 1-B) e diminui gradualmente e ligeiramente com o aumento das temperaturas testadas que variaram de 20°C a 100°C (figura 1-C), mas positivamente não apresenta pontos que demonstram perda completa de atividade inibidora. Na presença de DTT, a concentração de 1 μ M foi a única que não revelou perda da atividade inibitória do inibidor nos intervalos de tempo determinados, o que indica a presença de pontes de dissulfeto na estrutura da proteína (figura 1-D).

Figura 1: A, Curva de inibição para tripsina e quimotripsina para o inibidor purificado com projeção da tangente da curva para estimativa do molar ratio (inibidor enzima). B, Teste de estabilidade para determinação da atividade residual em diferentes pH's (pH 2-12). C, Teste de estabilidade para determinação da atividade residual em temperaturas (20-100°C). D, Teste de estabilidade para determinação da atividade residual em diferentes concentrações de DTT (0,1, 10, 100 μ M).



CONCLUSÕES

O inibidor proteinase obtido e caracterizado das sementes de *Chenopodium quinoa* apresenta grande potencial para futuros estudos físico-químicos e biológicos para a elucidação de seus mecanismos de ação e relação estrutura-atividade. No estudo, o resultado obtido para melhor meio de extração foi, através da agitação da farinha da quinoa em tampão NaCl 0,1M. Quanto ao tempo ótimo de extração, o melhor resultado apresentado foi o de 5h ($0,53 \pm 0,017$). No teste de aquecimento do meio de extração a melhor recuperação da atividade inibitória ocorreu no tratamento a 60°C.

Após etapas de purificação, o inibidor manteve a atividade inibitória em ampla faixa de pH (pH 2–12) nos estudos de estabilidade e apresentou uma pequena redução gradual com o aumento de temperatura (20–100°C) mas não houveram pontos com total perda da atividade. Na presença de DTT, apenas na concentração de 1 μ M não ocorreu a perda da capacidade inibitória nos intervalos de tempo predeterminados.

Através da curva de inibição é possível concluir que o inibidor de protease das sementes de *C. quinoa* demonstra maior afinidade para tripsina se comparado à quimotripsina apresentando um molar ratio próximo a 1,0 (inibidor/enzima) para tripsina.

REFERÊNCIAS

- (1) BHARGAVA, A; SHUKLA, S.; OHRI, D. *Chenopodium quinoa* – An Indian Perspective. **Industrial Crops and Products**, v. 23, p. 73-87, 2006.
- (2) LOSSO, J. N. The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v.48 (1), p. 94-118, 2008. Erratum in: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*; v.48 (8), p.798, 2008.
- (3) KANG, Z.; JIANG, J. H.; WANG, D.; LIU, K.; DU, L. F. Kunitz-type trypsin inhibitor with high stability from *Spinacia oleracea* L. seeds. **Biochemistry (Moscow)**; v4(1), p. 102-109, 2009.
- (4) KLMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; CHAUJAN, M. Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek). **Food chemistry**. v. 129, p. 1348-1354, 2011.