

DETECÇÃO DE ALCALOIDES EM TREMOÇO BRANCO (*Lupinus albus*) NA
FORMA DE FARINHA, CONCENTRADOS PROTEICOS E LIGADOS A
PROTEÍNAS PURIFICADAS POR SDS-PAGE

CHAMONE, M.E.; STEPHAN, M.P.; AZEVEDO, T.L.; ASCHERI, J.L.; ROSA, J.S.
& CASTRO, I.M.

RESUMO

O tremço é uma leguminosa rica em proteína e gordura e pobre em amido, tal como a soja. Entretanto, a presença de alcaloides na sua composição é um fator limitante para sua utilização na alimentação humana e animal. Este trabalho permitiu atestar que os alcaloides são quase na sua totalidade retirados após sucessivas lavagens dos grãos. Desta forma, teve-se como objetivo implantar um método qualitativo de análise de alcaloides, especificamente para farinha de tremço. Um novo método de obtenção de concentrado proteico também foi implantado, visando retirada de gordura e possivelmente dos alcaloides. Os solventes acetona e álcool 70% utilizados permitiram extrair somente a gordura representada por 11% de sólidos totais. Este concentrado mostrou ainda uma acentuada presença de alcaloides. Um estudo a nível molecular permitiu verificar que as três cadeias polipeptídicas obtidas nos concentrados proteicos reagiram também positivamente para alcaloides. Portanto, estas moléculas heterocíclicas se ligam às proteínas purificadas por eletroforese SDS-PAGE. Este estudo permitiu, então, propor uma nova estratégia analítica para detectar alcaloides numa matriz proteica sob três aspectos: na amostra integral, nos concentrados proteicos e nos seus perfis proteicos por eletroforese SDS-PAGE.

INTRODUÇÃO

Alcaloides quinolizidínicos (QAs) são moléculas heterocíclicas que ocorrem no tremço e em outras plantas e contêm nitrogênio como heteroátomo em sua estrutura. Além disto, estes compostos apresentam-se na forma bicíclica, tricíclica ou quadricíclicas, que se apresentam condensadas como anéis hexagonais (quinolizidínicos), ou a um heterocíclico pentagonal (indólicos) ou na forma de dois heterocíclicos pentagonais (pirrolidínicos). O gênero *Lupinus* apresenta uma ampla quantidade de metabólitos secundários entre eles, os principais alcaloides são lupininas, lupaninas e esparteínas como mostra a Figura 1. A preparação inadequada de tremço com imersão insuficiente permite que quantidades farmacologicamente significativas destes alcaloides permaneçam nos grãos, resultando em sintomas típicos de envenenamento, tais como pupilas dilatadas, confusão mental, desorientação, batimentos cardíacos e pressão arterial alterados (Schrenk et al., 2019). Porém, estas reações só ocorrem em concentrações elevadas destes compostos. Estes compostos heterocíclicos são encontrados nos seguintes tremços: branco (*Lupinus albus*), azul (*Lupinus angustifolius*), amarelo (*Lupinus luteus*) e no doce (*Lupinus mutabilis*) (Schrenk et al., 2019).

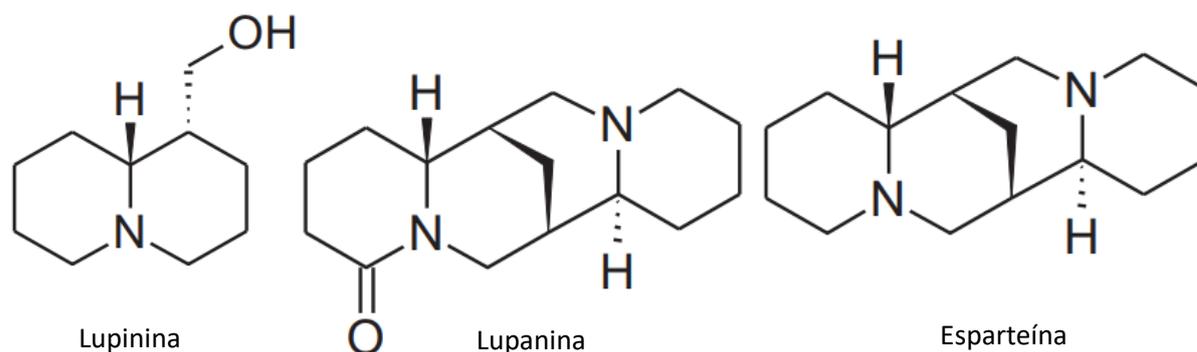


Figura 1: Estruturas químicas dos principais alcaloides encontrados no gênero *Lupinus* (tremoço).

As sementes apresentam até 40% de proteína em sua composição. Concentrados proteicos de tremoço têm mostrado menor quantidade de alcaloide e podem ser utilizados com eficiência como ingredientes com boas propriedades tecnológicas (Crews, 2014).

O objetivo deste trabalho foi avaliar: a) implantação de método qualitativo de análise de alcaloide, b) o efeito de lavagens na remoção dos alcaloides; c) um novo método de obtenção de concentrado proteico com retirada de gordura d), a presença dos alcaloides nos concentrados proteicos e por último, e) a ligação de alcaloides às proteínas purificadas por SDS-PAGE.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento aquoso para lavagens foi feito utilizando 2,8kg de grãos integrais de tremoço branco. Sete trocas de água foram realizadas, com retiradas de 400g de amostra, após molho e/ou cocção. Este total de oito amostras receberam as seguintes denominações: grãos integrais na seguinte ordem: “in natura” (I0), após 12h de molho (I1), após 12h de molho + 1h de cocção (I2), após 12h de molho + 1h de cocção + 24 h, 48 h, 60 h, 72 h e 84h de molho, correspondente, respectivamente, às seguintes amostras I3, I4, I5, I6, I7. Após a coleta das amostras, os grãos foram desidratados em estufa com circulação de ar a 50°C por 18h e posteriormente moídos em moinho de martelo, armazenando-se as farinhas no congelador. Para extração dos alcaloides foi utilizada a concentração de 1g de grãos desidratados para 15 mL de NaOH 0,1N. Na Figura 1(A, B), pode ser evidenciado que o reagente de Wagner (solução de I_2/KI comumente utilizada para a detecção de alcaloides) apresenta cor caramelo claro (Kloss, 2016). As amostras I0 até I7 mudaram a coloração de amarelo para marrom escuro, após adição do reagente de Wagner, com intensidades diferentes (Tabela 1), indicando que os alcaloides não foram totalmente retirados durante as lavagens (Wilczura et al., 2018). Visando a obtenção de concentrados proteicos isentos de alcaloides, foi feita uma estratégia alternativa para obtenção de concentrado proteico desengordurado. Primeiro, foram feitas lavagens da farinha na concentração de 0,5 mg/100ml usando etanol 70% para retirada de alcaloides mais apolares e em seguida desengorduramento destes grãos com acetona. Desde modo as proteínas foram concentradas devido à retirada da gordura, representados por 11,4% de sólidos totais (TABELA TACO 4ª EDIÇÃO). Desta forma as proteínas

foram concentradas, provavelmente devido aos 11% de gorduras extraídas, portanto, dos 33,6% de proteína presentes na semente geraram concentrado proteico com 37,3% de proteína. Estes valores estão dentro daqueles descritos por (Boukid & Pasqualone, 2021) onde foram evidenciados valores de proteína no concentrado variando 35-43%. Assim como observado para as farinhas de grãos lavados, o concentrado do grão I0 apresentou maior intensidade de cor do que o observado para o I7 (Figura 2). Deve-se ressaltar que para este ensaio os alcaloides foram extraídos usando NaOH (0,1M) em uma concentração de amostra de 6,7mg/100mL e para o concentrado proteico, obtido por desengorduramento da farinha, foi utilizada a concentração de 0,5 mg/100mL de amostra. Estes valores mostram que foram utilizadas massas aproximadamente 15 vezes maiores de extratos de farinha iniciais do que da usada para obtenção do concentrado proteico desengordurado. Ressalta-se que mesmo assim colorações intensas com o reagente de Wagner foram observadas (Figura 2). Considerou-se então uma segunda etapa de purificação, para a evidenciação a nível molecular, utilizando eletroforese SDS-PAGE com os dois concentrados proteicos (Figura 3A). Todas as cadeias polipeptídicas deram reação positiva com reagente de Wagner o que indicou que os alcaloides deviam estar ligados às proteínas (Figura 3B). Num segundo ensaio de eletroforese, após segunda etapa de purificação, as proteínas presumivelmente, estariam mais purificadas, porém, ainda assim se identificaram a possibilidade de haver alcaloides, pois todas as cadeias polipeptídicas que apareceram entre 89,64kDa e 43,87kDa, apresentaram a coloração típica do reagente Wagner. O teste de Wagner deu positivo, uma +, para o teste de alcaloide. I7, portanto, implica a presença de algum alcaloide nestas amostras. Nos padrões de massa molecular baixa da eletroforese não houve reação positiva e pode-se concluir que houve um bom controle negativo para esta reação (Figura 3B). Outros controles negativos foram utilizados, como em soja e arroz, nestes, as cadeias polipeptídicas mantiveram a coloração azulada que aparece com o corante cromassie blue R250 referente à técnica de eletroforese (Figura 3C).

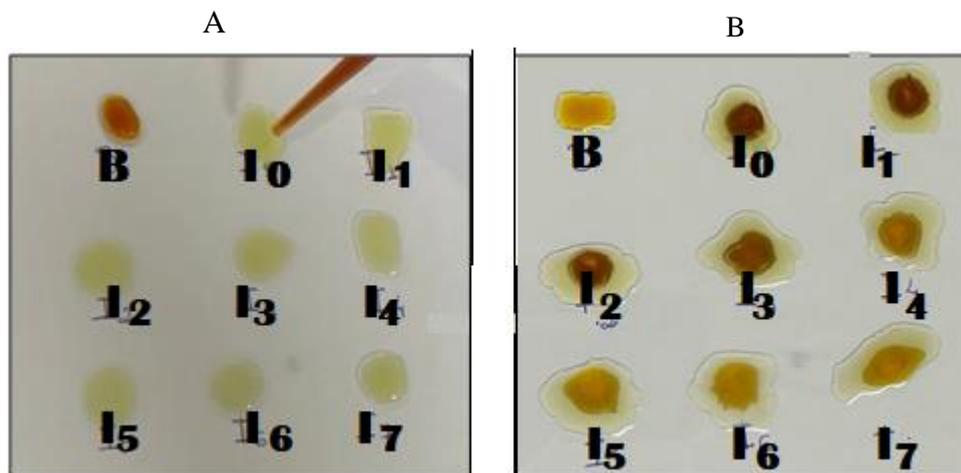


Figura 1: Avaliação qualitativa da presença de alcaloide durante vários processos de lavagens e cocção dos grãos de tremço branco - A) Amostra sem reagente de Wagner B) Amostra após a reação com reagente de Wagner. Observa-se a mudança de intensidade da cor marrom com o aumento do tempo de molho das amostras (I0 a I7).

Tabela 1: Intensidade de extratos de farinha de tremço extraídos com NaOH 0,1M

Amostras	Intensidade de cor
I0	++++
I1	++++
I2	++++
I3	+++
I4	++
I5	+
I6	+
I7	+

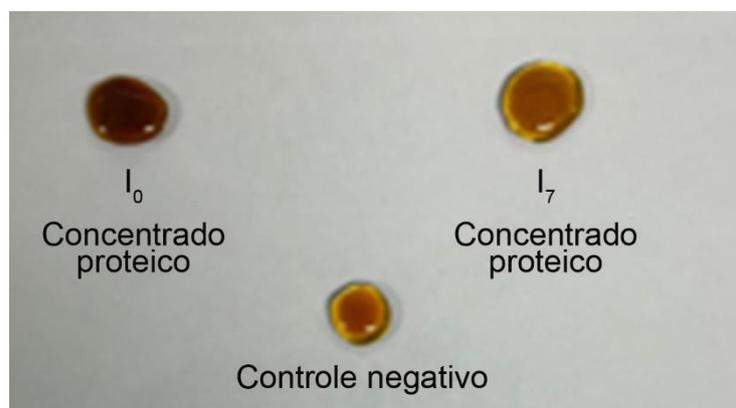


Figura 2: Avaliação qualitativa da presença de alcaloides em concentrado proteico desengordurado obtido de tremço (*Lupinus albus*)

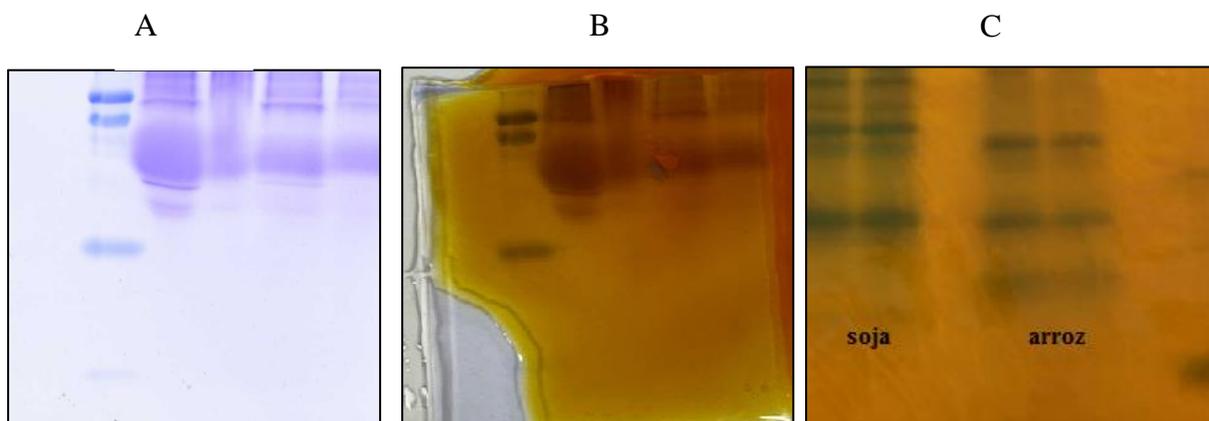


Figura 3: A) Caracterização da ligação dos alcaloide às cadeias polipeptícas purificadas obtidas a partir de concentrados proteicos de farinha de tremço em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). B) Cadeias polipeptídicas das bandas referentes a amostras com reação positiva com reagente de Wagner. C) Ausência de coloração das proteínas de arroz e soja em gel de poliacrilamida com reagente de Wagner.

CONCLUSÃO

Em consequência dos resultados, ficou evidente que o método, apesar de qualitativo e colorimétrico, obteve suficiente sensibilidade para detecção da presença de alcaloides, tanto nas farinhas das grãos integrais de tremoço, como em seus concentrados proteicos e em suas cadeias polipeptídicas purificadas por eletroforese SDS-PAGE. Foi verificado que as sucessivas lavagens com água diminuíram quase que totalmente a quantidade de alcaloides nos grãos estudados.

BIBLIOGRAFIA

Boukid, Fatma; Pasqualone, Antonella. Lupine (*Lupinus spp.*) proteins: Characteristics, safety and food applications. 2021. **European Food Research and Technology**. v.248, p.245-256.

Crews. C. Natural Oxidants.: Alkaloids. 2014, Encyclopedia of Food Safety v. 2: 251-260

Kloss, L.C., Albino, A.M., Souza, R.G.; Lima, R.A. Identificação de classes de metabólitos secundários de extratos etanólicos de *Pipper umbellatum* L. (PIPERACEAE). 2016. South American Journal of Basic Education, Technical and Technological. P. 118-128

Schrenk, D. et al. 2019. EFSA scientific opinion on the risks for animal and human health related to the presence of quinolizidine. Evaluation of the health risks related to the presence of cyanogenic glycosides in foods other than raw apricot kernels. 2019. **EFSA Journal**, v. 17, n. 11, p.5860.

TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP. 2011- 4. ed. rev. e ampl. - Campinas: **NEPA- UNICAMP**. 161 p.

Wilczura, S.; Swiżcicki. W; Kamel, K.A.; Wasik, W. 2018. colorimetric vs chromatographic analyses of alkaloids in lupin seed. **Plant breeding and seed science** v.78, p.63-67.