

## DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SAPONINAS TOTAIS EM GRÃOS DE *CHENOPODIUM QUINOA* E ANÁLISES DO GENE *TSARL1*

### RESUMO

A quinoa é um pseudocereal que possui alta qualidade nutricional comparado aos cereais tradicionais. Seus grãos não contêm glúten, possuem baixo teor glicêmico e apresentam propriedades funcionais devido à presença de compostos bioativos com capacidade antioxidante, minerais e vitaminas. O tegumento das sementes de quinoa pode possuir saponinas, compostos considerados fatores anti-nutricionais que conferem ao grão um sabor amargo e adstringente. O objetivo central desse estudo consistiu em quantificar o teor total de saponinas em genótipos de quinoa que estão sendo desenvolvidos no Brasil e realizar estudos biomoleculares do gene *TSARL1* que regula a biossíntese de saponinas. A quantificação de saponinas totais foi realizada usando metodologias de extração por ultrassom, por agitação por 24h e pelo método da espuma. Utilizando o método da espuma, o conteúdo de saponinas totais foi maior para o genótipo Q1331. O genótipo QMCR10 apresentou maior teor de saponinas nos métodos por ultrassom e por agitação por 24h. A metodologia de extração por agitação por 24 horas mostrou-se mais efetiva. Com a perspectiva de realizar futuras análises do gene *TSARL1*, foram construídos *primers* e uma região do gene foi amplificada.

### INTRODUÇÃO

*Chenopodium quinoa Willd* é membro da família *Chenopodiaceae* da qual também faz parte as olerícolas espinafre e beterraba. É uma planta nativa da região andina, destacando-se as maiores áreas de cultivo nos países: Equador, Bolívia e Peru <sup>[1][2][3]</sup>. É utilizada para a alimentação humana nessa região da América do Sul devido à herança cultural e pelo seu alto valor nutricional, porém fora dessa região, seu consumo é baixo, especialmente devido ao custo de importação dos grãos.

A semente de quinoa apresenta alta qualidade nutricional e elevado teor proteico devido à presença de aminoácidos essenciais <sup>[4][5]</sup>, fazendo com que ela seja um ótimo substituto para a carne. Os grãos possuem um bom equilíbrio de minerais e vitaminas, além de apresentarem compostos bioativos, como flavonoides e ácidos fenólicos, que possuem efeitos antioxidantes <sup>[4][7]</sup>. Portanto, a quinoa pode ser considerada uma cultura com potencial para contribuir com a segurança alimentar <sup>[2]</sup>.

Apesar de todos os benefícios nutricionais, ela também contém fatores anti-nutricionais, destacando-se as saponinas. As saponinas são metabolitos secundários (triterpenoides glicosídicos) encontrados no tegumento das sementes de quinoa. Nos alimentos, as saponinas conferem um sabor amargo e adstringente. Em vista disso, para o consumo, é interessante que elas sejam removidas do tegumento do grão, seja pelo processo de lavagem dos mesmos ou descascando-os, o que pode reduzir o valor nutricional do grão e aumentar consideravelmente o seu custo de produção <sup>[3]</sup>. O conteúdo de saponinas da quinoa depende principalmente do genótipo, podendo ser amargas ou doces. Em razão do elevado teor de saponinas presente em diversos genótipos, o desenvolvimento de cultivares com reduzido conteúdo desse composto é um dos principais objetivos do melhoramento da quinoa destinada à alimentação humana <sup>[8]</sup>.

A biossíntese de saponinas nas sementes é regulada por um gene denominado *triterpene saponin biosynthesis activating regulator 1 (TSARL1)* que possui um alelo que apresenta uma mutação do tipo polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*, SNP) com fenótipo dominante para a presença de saponinas <sup>[8]</sup>. A

expressão do gene *TSARLI* em sementes de quinoa é menor em genótipos doces que não possuem saponinas ou cujo teor é reduzido [8]. Assim, os estudos genéticos e moleculares combinados com as análises químicas e o melhoramento tradicional tornam-se importantes estratégias para identificar e desenvolver genótipos que podem ser cultivados no Brasil com potencial para aumentar a produção de alimentos altamente nutritivos e funcionais visando à promoção da saúde humana.

## OBJETIVO

O trabalho teve como propósito principal conduzir análises químicas para identificar e quantificar o teor de saponinas em grãos de genótipos de quinoa que estão sendo desenvolvidos por programas de melhoramento no Brasil e realizar análises genéticas visando estudar o gene *TSARLI* nesses genótipos.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

O conteúdo de saponinas totais, obtido pela análise da espuma [9], foi maior para o genótipo Q1331, seguido pelos genótipos Piabiru e Q1502. Os genótipos Q1310 e QMCR10 apresentaram teores menores (FIGURA 1).

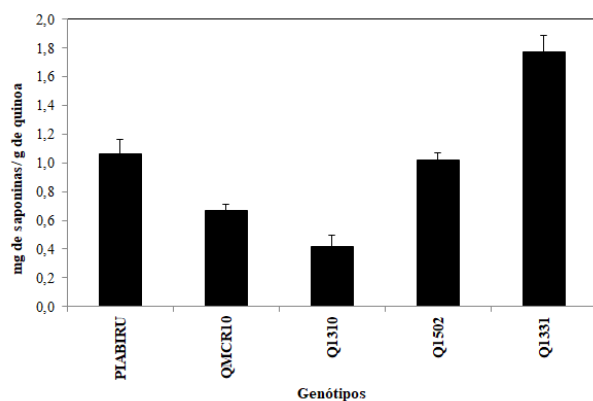


Figura 1: Análise do conteúdo de saponinas totais (mg de saponinas/g de quinoa) obtida pelo método da espuma [9]. É uma análise padrão da medida da altura da espuma (em cm) formada após a extração das saponinas de 0,5g de farinha integral de quinoa em 5 mL de água, com agitação por 30 segundos. Os resultados estão expressos como a média de quatro repetições e o desvio padrão.

A quantificação de saponinas totais também foi realizada baseada em duas metodologias de extração, uma por ultrassom por 20 minutos [10] e outra por agitação por 24 horas em agitador orbital shaker [8], ambas em solvente etanol:água 1:1 utilizando 2,5g farinha integral obtida a partir dos grãos de quinoa de cinco genótipos [8], usando o reagente Liebermann-Burchard, seguida da análise espectrofotométrica a 528nm.

Os maiores teores de saponinas usando o método por ultrassom foram encontrados para os genótipos QMCR10 e Q1310, acima de 350 mg de saponinas por 100 gramas de sementes de quinoa. O menor teor foi obtido para o genótipo Q1331 (Figura 2A).

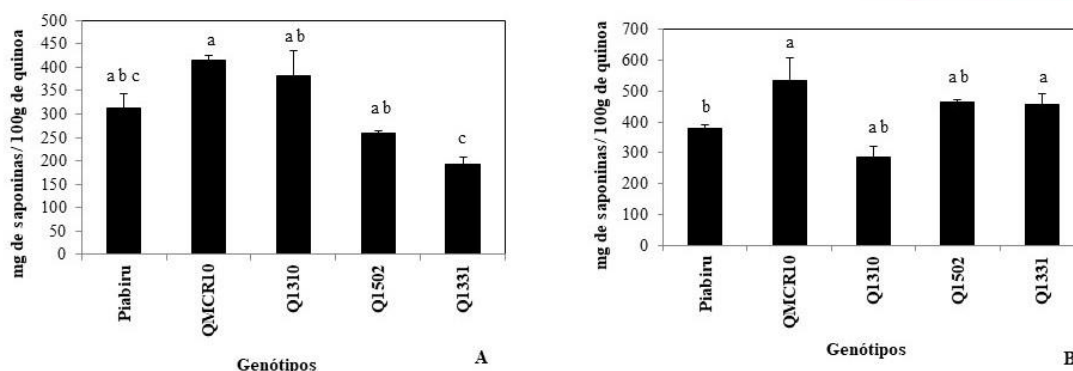


Figura 2: Teores de saponinas totais da farinha integral de 0,5g de sementes de quinoa obtidos pelos métodos do ultrassom (A) e da agitação por 24h (B). Os resultados foram expressos em mg de saponinas por 100 g de sementes de quinoa. Os valores correspondem à média de três repetições por genótipo e o desvio padrão. Letras iguais indicam que não houve diferenças estatísticas pelo teste Tuckey ( $p < 0,05$ ).

De maneira semelhante aos resultados encontrados utilizando a metodologia por ultrassom, ao empregar o método da agitação por 24h o genótipo QMCR10 demonstrou possuir maior teor de saponinas totais (Figura 2B). Entretanto, para o genótipo Q1310, o teor obtido foi menor, comparando-se com o primeiro método. E o teor do Q1331 foi maior do que o obtido pelo método do ultrassom (Figuras 2A e 2B). Ao comparar os resultados obtidos utilizando os métodos da agitação por 24h e por ultrassom, percebeu-se que usando esta segunda metodologia, os teores de saponinas obtidos foram menores para três genótipos QMCR10, Q1502 e Q133.

A extração por agitação por 24h mostrou-se mais efetiva devido ao fato de ter-se extraído maiores teores de saponinas. Contudo, devido ao fato do ultrassom ser um método mais rápido e eficiente, ele torna-se interessante para ser utilizado para analisar o teor de saponinas. As extrações por agitação e por ultrassom com o uso de etanol como solvente possibilitou uma rápida e eficiente extração de saponinas, mesmo a agitação que permaneceu por 24 horas ainda é um tempo consideravelmente menor do que extrações do tipo Soxhlet que podem perdurar por mais de 72 horas<sup>[13]</sup>. O fato de a saponina ser um componente em sua maioria tegumentar no grão de quinoa pode-se inferir que o seu teor total pode variar facilmente por ação de fatores físicos (danos mecânicos, umidade, temperatura, etc.), beneficiamento, armazenamento e colheita (manejo pre e pós-colheita). O teor de saponinas pode variar com a forma e o tempo de armazenamento e o tipo de beneficiamento. Os genótipos Q1502 e Q1331 podem ter apresentado variação maior dentre os demais genótipos devido ao beneficiamento inferior e à deterioração de parte das sementes. O genótipo Piabiru é considerado como ausente de saponinas<sup>[11]</sup>, porém mesmo o teor sendo baixo ele apresenta um teor de saponina de 320 mg de saponina por 100 gramas de quinoa. Todos os genótipos estudados podem ser classificados como amargos, pois apresentaram teor de saponinas  $>0,11\%$ , segundo normas técnicas<sup>[16]</sup>.

Com o teste de espuma, também foi possível discriminar os genótipos que apresentam teores maiores de saponinas. Para as amostras que possuem teor muito baixo, alguns fatores como armazenamento e deterioração podem afetar a leitura da altura da espuma, pois como a altura da espuma seria mais baixa, aumentaria a chance de erro ao medir a altura. Portanto, os resultados podem variar em todas as repetições que têm baixo teor de saponina.

A extração do DNA foi realizada segundo o método descrito por Sambrook et al. (1989) com modificações. Após, foi conduzida a eletroforese em gel de agarose para estimar a quantidade de DNA por amostra e a sua integridade.

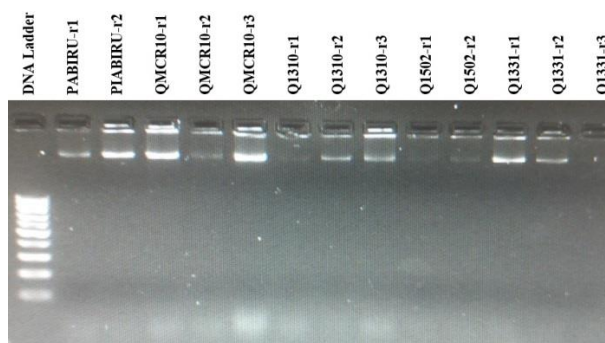


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% para quantificação do DNA e para avaliar a integridade do DNA. DNA Ladder corresponde ao marcador de peso molecular e de tamanho de fragmentos (Mid Range, Cellco). Acima da imagem, estão descritos os genótipos. r1 a r3 correspondem ao número de repetições.

Para a análise do gene *TSARLI*, foram construídos quatro pares de *primers* com o objetivo de amplificar o gene por completo. Os *primers* foram desenhados usando os *softwares* Primer3Plus (nº) e o PrimerBlast (nº) ambos livres e disponíveis em plataformas online. Os *primers* CqT13R e CqT16F foram desenhados no upstream e downstream, com objetivo de amplificar todo o exon 4 e exon 1.

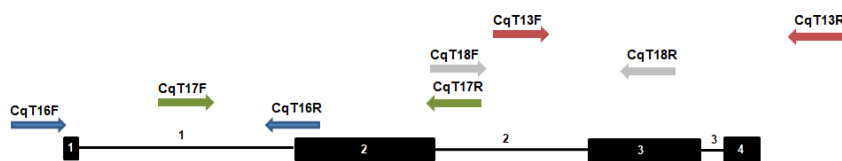


Figura 2: *Primers* construídos para o gene *TSARLI*. As setas para a direita indicam os *primers forward* e as setas para a esquerda sinalizam os *primers reverse*. As barras pretas representam os exons do gene e as linhas, os introns.

O *primer* CqT18 foi testado na PCR usando o genótipo Q1331, e amplificou a região de interesse com cerca de 740 pares de bases.

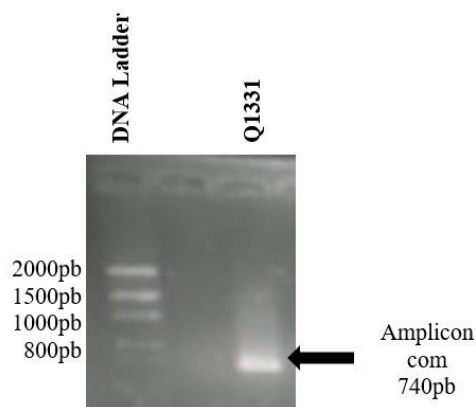


Figura 3: Amplificação do gene *TSARLI* do genótipo Q1331 utilizando o *primer* CqT18. O resultado da PCR foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1%. DNA Ladder (Mid Range, Cellco) é o marcador de peso molecular e de tamanho de fragmentos. pb significa pares de bases dos nucleotídeos do DNA.

## CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o método de extração mais eficiente para todos os genótipos foi por agitação por 24 horas. Mesmo a extração por ultrassom sendo igual estatisticamente

ao da agitação em alguns genótipos (Piabiru, Q1310) ela apresentou uma queda de rendimento em outros (Q1502, Q1331). A quantificação de saponinas pelo método da espuma mostrou-se semelhante entre os nossos genótipos.

Todos os genótipos estudados podem ser classificados como amargos, pois apresentaram teor de saponinas  $>0,11\%$ , segundo as normas técnicas.

A obtenção do DNA dos genótipos e a amplificação do gene *TSARL1* são importantes estratégias para verificar se polimorfismos no gene estão associados ao teor de saponinas nas amostras. Dessa forma, em trabalhos futuros, pretende-se amplificar todas as regiões do gene e realizar o sequenciamento para a identificação de polimorfismos.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. LIM, J. G.; PARK, H. M.; YOON, K. S. Analysis of saponin composition and comparison of the antioxidant activity of various parts of the quinoa plant (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Sci Nutr*, v. 8, p. 694-702, 28 nov. 2019.
2. EL HAZZAM, K et al. An Insight into Saponins from Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd): A Review. *Revista Molecules*, v. 25, n. 5, p. 1-22, mar. 2020.
3. KOZIOL, M. J. Composición química y evaluación nutricional de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 5, p. 35–68, 1992.
4. VEGA-GÁLVEZ, A. et al. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 90, n. 15, p. 2541–2547, 2010.
5. REPO-CARRASCO, R., Espinoza, C., Jacobsen, S.E. Nutritional value and use of the andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Rev. Int.*, v. 19, n 1, p. 179-189, 2003.
6. FIALLOS-JURADO, J. et al. Saponin determination, expression analysis and functional characterization of saponin biosynthetic genes in *Chenopodium quinoa* leaves. *Plant Science*, v. 250, p. 188–197, 2016.
7. JARVIS, D. E. et al. The genome of *Chenopodium quinoa*. *Nature*, v. 542, n. 7641, p. 307–312, 2017.
8. LOZANO, M. et al. Cuantificación De Saponinas En Residuos De Quinoa Real *Chenopodium Quinoa* willd. *Revista boliviana de química*, v. 29, n. 2, p. 128–135, 2012.
9. **Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria QUINUA. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SAPONINAS POR MEDIO DEL MÉTODO ESPUMOSO (MÉTODO DE RUTINA)**. . [s.l: s.n.].
10. NAVARRO DEL HIERRO, J. et al. Ultrasound-assisted extraction and bioaccessibility of saponins from edible seeds: quinoa, lentil, fenugreek, soybean and lupin. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, v. 109, p. 440–447, 1 jul. 2018.
11. NICKEL, J. et al. Effect of different types of processing on the total phenolic compound content, antioxidant capacity, and saponin content of *Chenopodium quinoa* Willd grains. *Food Chemistry*, v. 209, p. 139–143, 15 out. 2016.
12. SPEHAR, C. R. Adaptação da quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) para incrementar a diversidade agrícola e alimentar no Brasil. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, v. 23, n. 1, p. 41–62, 2006.
13. WOLDEMICHAEL, G. M.; WINK, M. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 5, p. 2327–2332, 2001.
14. Primer3Plus. Pick primers from a DNA sequence. Disponível em: <https://www.primer3plus.com/>. Acesso em 2 jul. 2022.
15. PrimerBlast. A tool for finding specific primers. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Acesso em 10 jun. 2022.
16. Gomez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., & Caboni, M. F. (2011). Simultaneous determination of phenolic compounds and saponins in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) by a liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 10815–10825.