

# Avaliação do potencial biotecnológico e farmacológico (determinação das atividades hemaglutinante e inibidora de proteases) de sementes de mostarda

## *Evaluation of biotechnological and pharmacological potential (determination of hemagglutinating and protease inhibitor activities) of mustard seeds*

R. P. Serquiz<sup>1</sup>; A. H. A. Moraes<sup>2</sup>; D. S. P. Sátiro<sup>3</sup>; A. C. Serquiz<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduado em Biomedicina. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. E-mail: raphaserquiz@hotmail.com

<sup>2</sup>Doutora em Biologia Molecular. Professora da Universidade do Rio Grande do Norte - UFRN. E-mail: aharaujomoraes@gmail.com

<sup>3</sup>Mestre em Biotecnologia pela Universidade Potiguar - UnP. Professor da Universidade potiguar – UnP. E-mail: disraeli.silva@unp.br

<sup>4</sup>Mestre em Bioquímica. Doutorando do CCS. Professor da Universidade potiguar – UnP. E-mail: alexandreserquiz@gmail.com

\*E-mail: raphaserquiz@hotmail.com

(Recebido em 12 de junho de 2015; aceito em 24 de maio de 2017)

### RESUMO

A busca pelo aumento da qualidade e expectativa de vida trouxe mudanças na cultura comportamental e alimentar dos indivíduos, levando-os a buscar um estilo de vida mais saudável, o que inclui atividade física e boa alimentação. Essas mudanças, ocasionaram uma redução do risco de desenvolvimento de doenças degenerativas, e, dentre os alimentos identificados como benéficos, as oleaginosas ganham destaque pelas suas propriedades anticarcinogênica, anti-inflamatória e antioxidante, auxiliando na diminuição desses riscos. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial biotecnológico e farmacológico, através da determinação das atividades hemaglutinante, inibidora de protease e avaliação do conteúdo de compostos fenólicos em sementes e molhos a base de mostarda. Tanto a semente quanto os molhos de mostarda apresentaram quantidades significativas de compostos fenólicos totais, que variam entre 0,189 – 0,24 mg/g equivalentes a ácido gálico, e atividades inibitórias para tripsina, entre 33-90% e quimotripsina entre 0,1-54%, deixando em evidência que a semente, quando comparada com os molhos, apresenta valores mais expressivos dentro das atividades avaliadas.

**Palavras – chave:** Semente. Mostarda. Oleaginosa. Compostos fenólicos. Atividade inibitória.

### ABSTRACT

The quest for increase life quality and expectancy brought changes in behavioral and food culture of individuals, leading them to seek a healthier lifestyle, including physical activity and good nutrition. These changes led to a reduction of degenerative diseases risks, and among the foods identified as beneficial, oilseeds gain prominence for its anticarcinogenic, anti-inflammatory and antioxidant properties, helping to decrease these risks. The aim of this study was to evaluate the biotechnical and pharmacological potential, by determining the hemagglutination activity, protease inhibitor and evaluation of the content of phenolic compounds in seeds and mustard sauces base. It was shown that as much seed as sauces have significant quantities of phenolic compounds, ranging from 0.189 – 0.24 mg/g gallic acid equivalents, and inhibitory activity for trypsin, between 33-90% and chymotrypsin, between 0.1-54%, leaving evidence that the seed compared with the sheaves, shows higher values in the activities evaluated.

**Keywords:** Seed. Mustard. Oilseed. Phenolic compounds. Inhibitory activity.

---

## 1 INTRODUÇÃO

A saúde humana está diretamente relacionada ao tipo de alimentação consumida pelo indivíduo. Sendo assim, as pesquisas sobre as propriedades dos alimentos têm se tornado cada vez mais importantes<sup>[1]</sup>. A evolução da ciência dos alimentos busca, com o auxílio de novas tecnologias, possibilitar o reconhecimento de substâncias que promovem efeitos positivos no organismo quando ingeridos da forma correta<sup>[2]</sup>.

Alimento funcional é todo alimento ou componente de alimentos e bebidas que oferecem um benefício saudável positivo, além de seu valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico para a prevenção e o tratamento de doenças <sup>[3,4]</sup>. Tais alimentos estão hoje entre os grandes avanços conseguidos pelo homem no intuito de promover e proporcionar saúde com qualidade de vida. Suas propriedades relacionadas à saúde podem ser provenientes de constituintes normais, ou através da adição de ingredientes que modificam suas propriedades originais, tais como: fibras alimentares, oligossacarídeos, proteínas modificadas, peptídeos, carboidratos, antioxidantes, minerais, outras substâncias naturais e microrganismos<sup>[5]</sup>.

As oleaginosas, cada vez mais, ganham destaque dentre os alimentos que promovem benéficos à saúde, independente do seu alto valor lipídico<sup>[6]</sup>. O consumo

de sementes demonstra uma melhora na qualidade da dieta e hábitos alimentares saudáveis<sup>[7]</sup>, e segundo a FDA (*Food and Drug Administration*) recomenda-se o consumo em até 5 vezes por semana (140 g/semana).

A semente de mostarda (*Brassica juncea*) possui poucos estudos que comprovam benefícios em seu consumo, mas seu potencial se destaca dentre as sementes por ser popular entre as especiarias e temperos consumidos em todo o mundo, especialmente na China, Índia e Canadá. Sementes de brássicas e outras crucíferas, tem sido conhecidas por conter Tioglucosídeos, conhecidos como glicosinolatos, sendo estes, e seus produtos finais, o grupo mais importante de substâncias nocivas<sup>[8]</sup>.

Sementes de mostarda apresentam perfil anticancerígeno e anti-inflamatória devidos aos seus vários componentes, tais como ácido erúico e compostos fenólicos, que são ativos no processo de anti-oxidação e eliminação de radicais livres<sup>[9]</sup>. Estudos mostram também uma redução significativa do colesterol total sérico, LDL, VLDL e triglicérides<sup>[10]</sup>.

A semente de mostarda é uma valiosa fonte de proteína com uma composição bem equilibrada em aminoácidos, sendo então uma potencial fonte para peptídeos bioativos<sup>[11]</sup>, além de fonte de compostos fenólicos que se destacam por possuírem capacidade antioxidante e, portanto, podem assumir papel relevante na diminuição do risco de doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, Mal de Alzheimer e Parkinson<sup>[12]</sup>.

Dentro os vários peptídeos em destaque na ciência, os inibidores de tripsina e quimotripsina, mostram-se cada vez mais promissores, com destaque no tratamento de várias patologias das quais podemos destacar a obesidade, onde atuam promovendo a sensação de saciedade<sup>[13]</sup>, e as lectinas, que podem se ligar a certos componentes do glicocálix das células sanguíneas, provocando hemaglutinação. Esta última é amplamente testada em células cancerígenas, se mostrando eficiente na diminuição da divisão celular em várias linhagens de câncer<sup>[14]</sup>.

Portanto, o presente estudo averiguou a presença de moléculas de interesse biotecnológico e farmacológico em sementes de mostarda e molhos a base de semente de mostarda.

## 2 MÉTODO

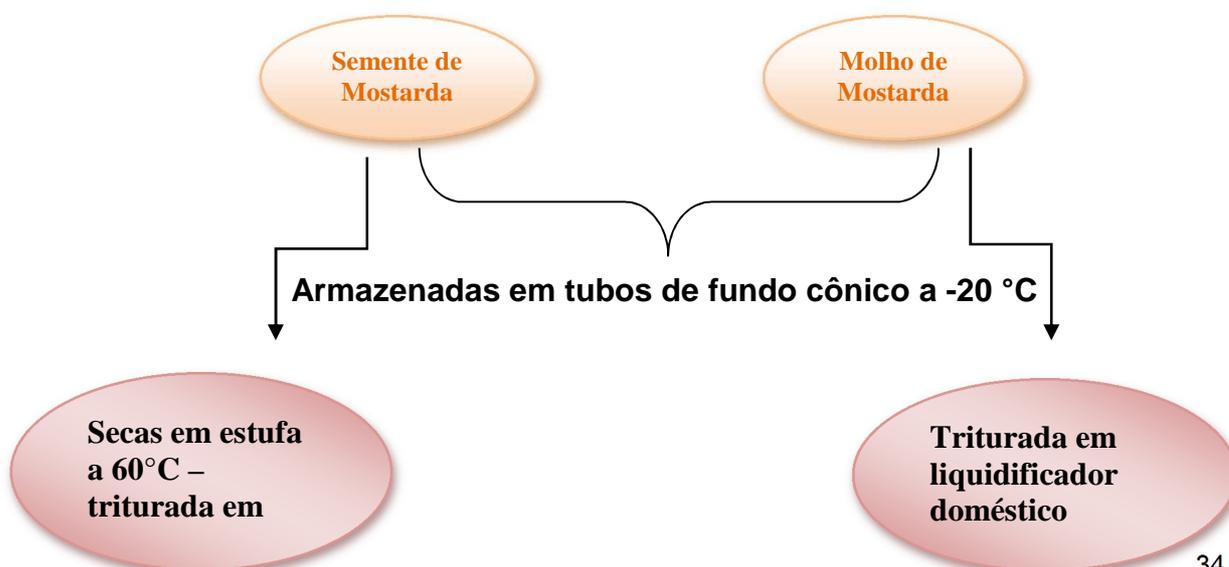
As amostras de semente de mostarda e molhos de mostarda foram obtidas comercialmente na cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. Os reagentes, enzimas e os equipamentos que foram utilizados durante os experimentos, foram obtidos e usados no Laboratório de Química de Proteínas Bioativas, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

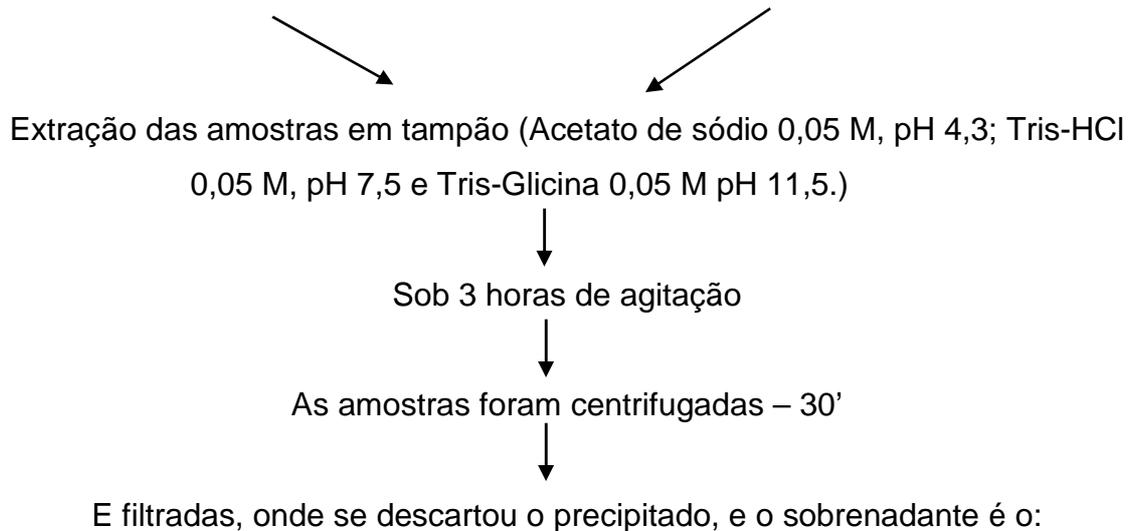
Os equipamentos utilizados foram: Agitador Magnético – Multistirrer Magnetic Stirrer; Agitador de tubos – Phoenix – AP 56; Banho Maria Tecnal - TE – 056; Balança eletrônica - Tecnal - (mod. B - tec 2200); Centrífuga - Eppendorf - 5804 R; Concentrador - Eppendorf - 5301; Espectrofotômetro Amersham Biosciences - Ultrospec 2100 pro.; Liquidificador doméstico – Bluesky; Moinho Tecnal - 631/2.

Os reagentes utilizados nos experimentos foram: Ácido acético (Vetec, Brasil); Ácido Clorídrico (Dinâmica, Brasil); Ácido gálico (Vetec, Brasil); BAPNA (benzoil arginina nitroanilida - Sigma, USA); BSA (Bovine Serum Albumin - Sigma, USA); Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (Vetec, Brasil); Bradford (Sigma, USA); Enzima tripsina bovina (Sigma, USA); Folin Ciocalteau (Sigma, USA); Trizma Base (Sigma, USA).

### Preparo do extrato bruto da semente de mostarda e molho de mostarda.

**Figura 1:** Esquema do preparo do extrato bruto da semente de mostarda e do molho de mostarda.





*Fonte: Do autor.*

As sementes e os molhos foram extraídos manualmente. As amostras foram armazenadas separadamente em tubos de fundo cônico a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos experimentos. Para o preparo do extrato bruto, as sementes foram secas em estufa ventilada a  $60^{\circ}\text{C}$  e em seguida trituradas em moinho industrial resfriado; as amostras de molho de mostarda não foram processadas. A extração ocorreu em tampão (Acetato de sódio, pH 4,3; Tris-HCl 0,05 mM, pH 7,5 e Tris-Glicina pH 11,5) na proporção 1:10 sob 3 horas de agitação constante. Decorrido o período de agitação, as amostras foram centrifugadas a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos na rotação de  $8000 \times g$ . Em seguida, a solução obtida foi filtrada com auxílio de funil e algodão, onde seu precipitado foi descartado e o sobrenadante armazenado, e denominado extrato bruto.

### **Dosagem de Proteínas**

Todas as determinações proteicas foram realizadas pelo método de Bradford com modificações<sup>[15]</sup>.  $10\mu\text{l}$  das amostras e  $1000\mu\text{l}$  do reagente de Bradford foram adicionados em tubos de hemólise para reação. Como branco, em um tubo foram adicionados  $10\mu\text{l}$  de tampão Tris-HCl 0,05 mM pH 7,5 e  $1000\mu\text{l}$  do reagente de Bradford. As leituras das absorbâncias foram realizadas a  $595\text{nm}$ .

## **Avaliação dos compostos fenólicos totais**

O conteúdo de fenólicos totais foi mensurado em triplicata, sendo repetidos os ensaios por três vezes para cada extrato conforme o método de Swain e Hills<sup>[20]</sup>. Dessa forma, foi feita uma curva analítica com o ácido gálico contendo 200, 100, 50, 20, 10, 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Foram adicionados primeiramente aos tubos de ensaio 200 $\mu\text{l}$  dos extratos de semente de mostarda e molho de mostarda, e em seguida 1400 $\mu\text{l}$  de água ultrapura e 100 $\mu\text{l}$  do reagente de Folin. Posteriormente os tubos foram agitados e mantidos em repouso por 10' a temperatura ambiente. Após esse procedimento, foram adicionados 50 $\mu\text{l}$  de  $\text{NaHCO}_3$  a 20%, os tubos foram novamente agitados e mantidos em banho-maria a 40°C por 20'. O branco foi preparado a partir do mesmo procedimento, substituindo a adição da amostra pelo tampão utilizado na extração. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 765nm em espectrofotômetro e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g de peso seco da amostra.

## **Avaliação dos Compostos Bioativos**

Os extratos brutos das duas amostras tiveram suas atividades inibitórias testadas para tripsina, quimotripsina, atividade hemaglutinante.

### **Atividade inibitória para tripsina**

As atividades inibitórias para tripsina nas amostras de semente e molho de mostarda foram avaliadas em triplicata, sendo repetido os ensaios por três vezes e determinadas como descrito por Kakade<sup>[16]</sup>. Inicialmente foram adicionados 10 $\mu\text{l}$  da enzima tripsina nos tubos de ensaio. Em seguida foram adicionados 120 $\mu\text{l}$  de ácido clorídrico 2,5 mM e 100 $\mu\text{l}$  das amostras separadamente, exceto no controle onde o volume de amostra foi substituído pelo tampão de extração. Posteriormente foi adicionando tampão Tris-HCl 0,05 mM, pH 7,5 para obter o volume final de 790 $\mu\text{l}$ . Os tubos foram então levados para banho-maria 37°C por 10 minutos, adicionando-se em seguida, 500 $\mu\text{l}$  de substrato BAPNA 1,25mM em todos os tubos com exceção dos

brancos, e deixando-os no banho-maria por mais 15 minutos. A reação foi parada com a adição de 120µl de ácido acético 30% em todos os tubos, sendo adicionados após a parada da reação 500µl de BAPNA 1,25mM nos brancos. O resultado foi mensurado por meio de leitura em espectrofotômetro a 405nm. Os resultados foram expressos em UI/mg de peso seco da amostra. A unidade de inibição (UI) representa a diferença entre a atividade do controle (enzima) e dos testes (amostras), sendo 1 UI igual a 0,01 unidades de absorvância.

### **Atividade Inibitória para Quimotripsina**

Para avaliação da atividade da enzima quimotripsina é utilizado o substrato Azocazeína 1%. Em seu preparo 1g do substrato foi solubilizado em 100mL de tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5. A solução foi fervida por cerca de 15 minutos e após resfriada o volume foi completado com água destilada. A solução foi conservada a -20° C até sua utilização.

Na atividade inibitória para quimotripsina foram utilizados 20µl de solução de quimotripsina bovina (0,2mg/mL em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5, contendo CaCl<sub>2</sub> 20mM) e 100µl do inibidor. Essa mistura foi mantida por 15 minutos a 37° C. Após esse período a reação foi iniciada adicionando-se 200µL de Azocazeína 1%. Decorridos 30 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 300µl de solução de TCA 20%. A mistura de reação foi então centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante alcalinizado com NaOH 2N na proporção 1:1 (v/v). A solução obtida foi lida em espectrofotômetro a 440nm. Provas em branco e controle foram realizadas e os ensaios foram feitos em triplicata.

### **Atividade hemaglutinante**

A atividade foi realizada pelo método proposto por Pusztai [18]:

- Preparo de Eritrócitos

Alíquotas de 2mL de eritrócitos humanos dos tipos A, B e O foram lavados com 8mL de solução salina 0,9% e centrifugados a 3200 x g por 5 minutos, até a obtenção

de uma massa de eritrócitos livre de soro e material de hemólise. O hematócrito foi realizado e soluções de eritrócitos a 4% foram preparadas em solução salina 0,9%.

- Ensaio de hemaglutinação

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados por meio de diluição seriada em placas de 96 poços com fundo em formato de “V”. Em cada poço foram adicionados 25µL de solução de NaCl 0,9% 25µL das amostras separadamente e 25µL da suspensão de eritrócitos a 4%. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora e avaliada visualmente pela presença ou ausência de hemaglutinação, considerando o resultado como sendo título da maior diluição com reação positiva.

### **Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS-Page**

A eletroforese foi feita, segundo o método desenvolvido por Laemmli<sup>[17]</sup>. Foram utilizadas placas de vidro (10x10cm), espaçadores de 0,75mm. O gel de separação foi preparado na concentração de 15% contendo. O gel de concentração foi preparado, na concentração de 3,5%.

As amostras proteicas contendo 9ug de proteína, foram secas e reconstituídas em tampão de amostra constituído de tris-HCl 0,0625 M, SDS 2%, glicerol 10% v/v, 0,01% de azul de bromofenol num volume de 10µL. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 16mA por aproximadamente 2,5 horas. O fim da corrida foi marcado com saída de todo azul de bromofenol do gel de poliacrilamida.

Após a eletroforese os géis foram corados segundo procedimento descrito por WEBER e OSBORNE (1969). A solução corante foi preparada usando-se Comassie Blue R-250 a 1%, metanol 40%, ácido acético 10% em água. O descoramento foi feito com solução contendo ácido acético 10% e metanol 40%.

### **3 ANÁLISE DOS DADOS**

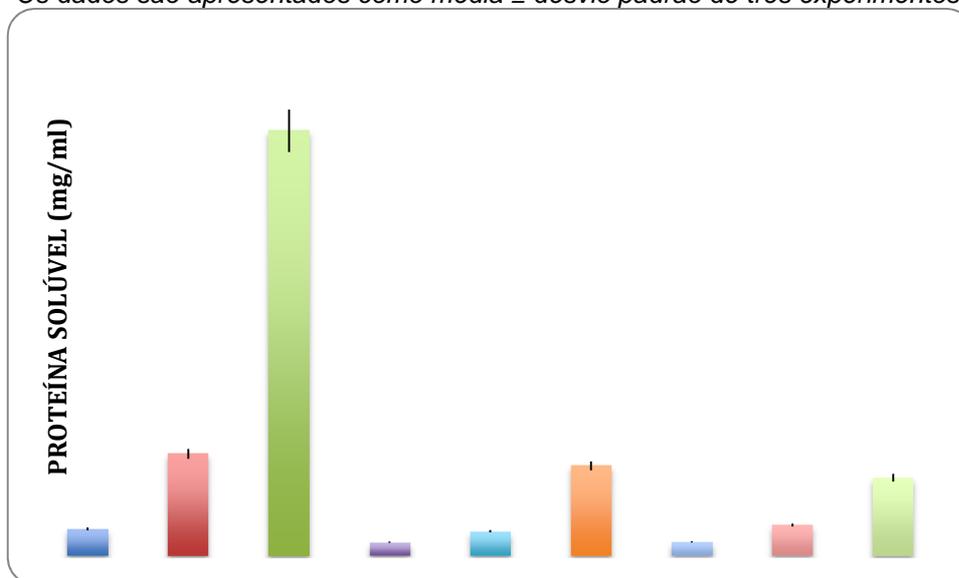
Os dados foram tabulados e analisados através de estatística descritiva no Microsoft Excel, versão XP.

## 4 RESULTADOS

### Dosagem de Proteínas

Os resultados referentes à dosagem de proteínas, ou seja, à quantidade de proteínas solúveis, foi detectada pelo método de Bradford <sup>[15]</sup>. Observou-se que a quantidade de proteínas solúveis extraídas da semente nos tampões de tris-glicina e tris-HCl (3,35 mg/mL e 0,8 mg/mL) superam as amostras extraídas dos molhos 1 e 2 (0,8 mg/mL no máximo).

**Gráfico 1** – Dosagem de proteínas para amostras de semente de mostarda e molhos de mostarda. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos.



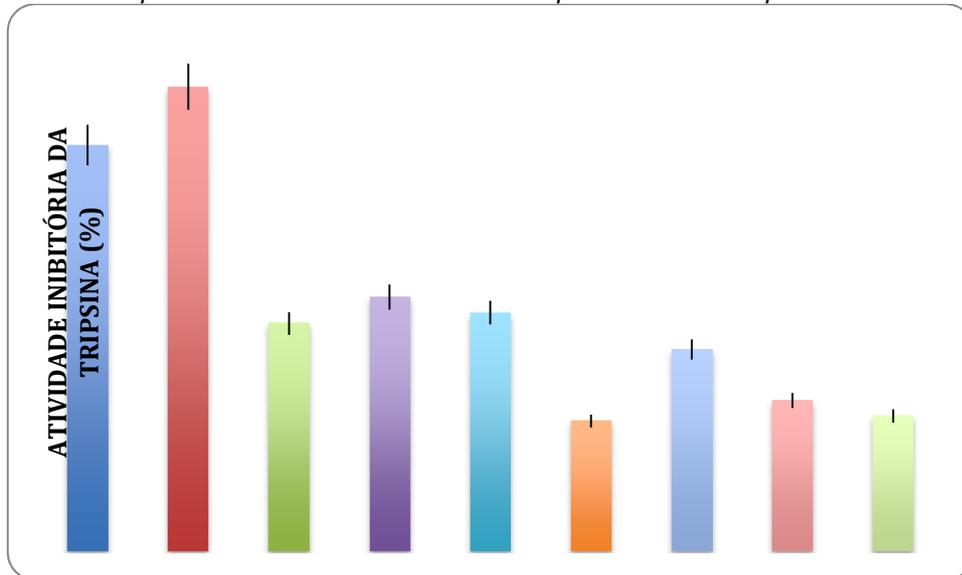
Fonte: Do autor.

### Atividade Inibitória para Tripsina

Os resultados das atividades inibitórias para tripsina das três amostras revelam que tanto a semente de mostarda quanto os molhos, apresentaram atividade antitriptica. No entanto, dentre os extratos, o da semente foi o que apresentou maior atividade inibitória para tripsina. As extrações de semente com tris-HCl e tris-glicina apresentaram maior atividade na amostra da semente de mostarda (90 e 77%, respectivamente). De maneira similar à semente, os molhos 1 e 2 apresentaram melhor atividade antitriptica nas extrações com tampões de pH mais alcalino, sendo

a atividade mais forte encontrada no extrato obtido com tris-glicina e posteriormente com tris-HCl (Gráfico 02).

**Gráfico 2** – Atividade inibitória de tripsina para, semente mostarda e molho de mostarda. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos.

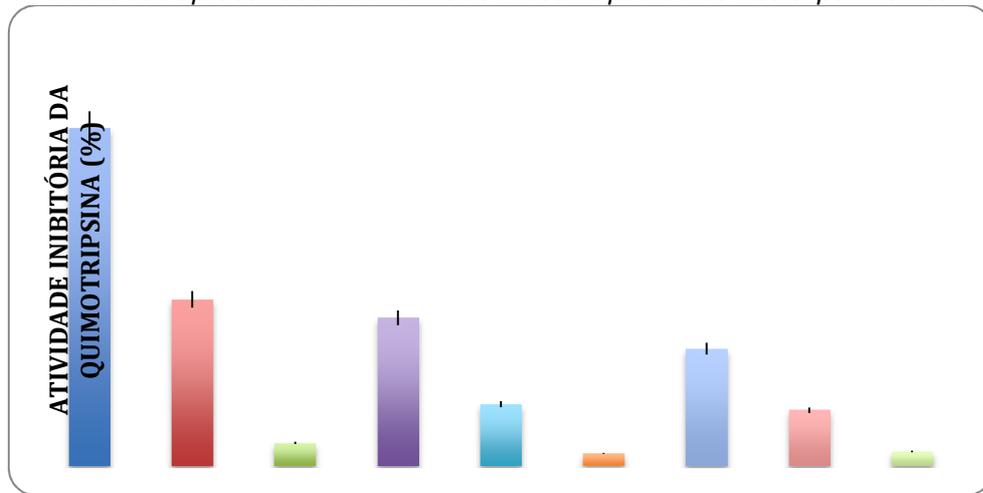


Fonte: Do autor.

### Atividade Inibitória para Quimiotripsina

Os resultados das atividades inibitórias para quimiotripsina das três amostras revelam grande diferença entre os tampões de extração, onde o tampão de pH mais baixo parece ser a melhor opção para obtenção da molécula inibidora, ao contrário dos inibidores de tripsina que pareceram melhor extraídos em tampões de pH neutro/alcalino (Gráfico 03).

**Gráfico 3** – Atividade inibitória de semente mostarda e molhos de mostarda para quimotripsina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos.

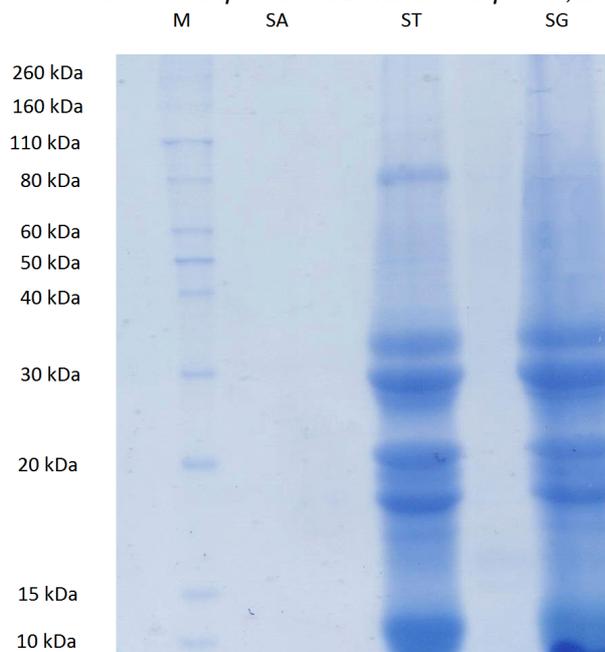


Fonte: Do autor.

### Eletroforese em Gel Poliacrilamida

No gel de eletroforese da (figura 2) podemos visualizar bandas proteicas em maior destaque com peso molecular entre 10 KDa a 40 KDa, uma faixa características das famílias dos Inibidores estudados.

Figura 2 – Gel de eletroforese (SDS-Page) dos extratos obtidos de semente de mostarda. M – Marcador de Peso Molecular; SA – Extrato de semente obtido com tampão acetado de sódio 50mM pH 4,3; ST – Extrato de semente obtido com tampão tris-HCl 50mM pH 7,5; SG – Extrato de semente obtido com tampão tris-Glicina 50mM pH 11,5.



Fonte: Do autor.

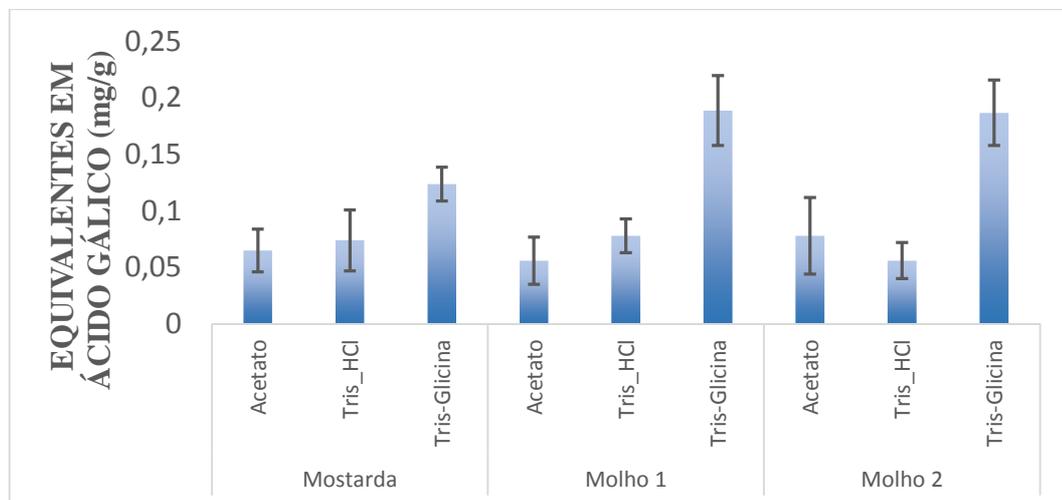
## Atividade Hemaglutinante

As amostras testadas não apresentaram atividade hemaglutinante dentro das condições do método usado para avaliação.

## Conteúdo de Compostos Fenólicos Totais.

Os resultados de compostos fenólicos das amostras da semente de mostarda e do molho de mostarda 1 e molho de mostarda 2, não apresentaram quantidades significativas de compostos fenólicos totais nas amostras em diferentes tampões. As amostras com tris-glicina mostram valores aumentados quando comparados com os outros tampões nas três amostras (semente, molho 1 e 2 de mostarda) onde foi encontrado, (0,124, 0,189, 0,187 mg/ g equivalentes de ácido gálico) (Gráfico 04).

Gráfico 04 - Conteúdo de compostos fenólicos da semente de mostarda e do molho de mostarda. Os resultados são expressos como equivalentes de miligramas de ácido gálico/ grama de amostra. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos.



Fonte: Do autor.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela dosagem de proteínas mostraram que a semente de mostarda apresenta maior quantidade de proteínas solúveis que os demais extratos. O molho de mostarda 1 e 2 também apresentaram resultados positivos para presença de proteínas solúveis, mas em uma quantidade não tão significativa quanto

a semente. Os tampões que aparentemente são mais eficazes na obtenção de proteínas solúveis foram os tampões de tris-glicina e tris-HCl, evidenciando assim que o pH neutro à alcalino é capaz de obter mais proteínas da mostarda do que o pH ácido.

Na detecção da atividade inibitória para tripsina foi constatada a presença de inibidores nas amostras analisadas. No entanto, ao se realizar o método de Bradford [15] para quantificação proteica, foi verificada uma variação na presença de proteínas solúveis significativas apenas na amostra de semente em tris-glicina, tris-HCl e no molho 1 e 2 em tris-glicina. A presença da atividade antitriptica, tanto pode ser justificada pela presença de proteínas solúveis, as quais podem exercer este tipo de inibição (inibidores de origem proteica), como pela presença de compostos fenólicos, que nos extratos obtidos com tris-glicina dos molhos 1 e 2, apresentam-se aumentados.

Estudos mostram que os inibidores de tripsina de origem proteica podem promover efeitos benéficos à saúde, dos quais podemos citar: efeitos anticancerígenos [20], ações anti-inflamatórias [21] e efeito sociogênico [13], sendo este último o que acontece através de uma maior liberação do hormônio colecistoquinina (CCK) pela mucosa do intestino, hormônio reconhecidamente sacietogênico [22].

Na detecção da atividade inibitória para quimotripsina pode-se constatar que em todas as amostras, tanto para semente quanto para os molhos de mostarda, foi detectada atividade inibitória, sendo a semente quem apresentou maior percentual de inibição e atividade em todos os extratos, chegando a ser superior aos molhos. A atividade inibitória presente na semente e nos molhos de mostarda, tanto pode ser originada por compostos fenólicos como por inibidores proteicos, tendo em vista que ambos foram detectados nas amostras e que os compostos fenólicos também atuam como inibidores proteicos ligando-se à estrutura da enzima e impedindo-a de atuar sobre seu substrato [23,24].

É provável que proteínas bioativas estejam relacionadas com a inibição de quimotripsina encontrada nas amostras de semente de mostarda, pois ela apresentou grande quantidade de proteínas, o que foi comprovado pela eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page e Page, que nos mostra uma variação de valores entre 10 kDa a 40 kDa, uma faixa características das famílias dos inibidores estudados. Isso mostra que essa possível molécula proteica com atividade inibitória, pode contribuir biotecnologicamente na pesquisa e produção científica, e como consequência, trazer

benefícios à população. Em estudos realizados usando um sistema experimental *in vivo*, foi descoberto que o tratamento com inibidores de quimotripsina inibe a capacidade dos neutrófilos para emigrar para locais de inflamação, tendo assim efeito anti-inflamatório<sup>[25]</sup> e na prevenção do câncer, podendo também atuar como supressor de diversos estágios da carcinogênese, incluindo iniciação, promoção e progressão<sup>[26]</sup>.

O resultado da dosagem de compostos fenólicos das amostras de semente e dos molhos 1 e 2 de mostarda não apresentaram quantidades significativas de componentes fenólicos totais. No entanto, observa-se que nos três extratos obtidos com tris-glicina as quantidades de compostos fenólicos apresentam-se superiores quando comparadas com os outros tampões, tendo sido encontrados 0,124, 0,189, 0,187 mg/g de equivalentes em ácido gálico nos extratos obtidos com tris-glicina. Se compararmos com estudos feitos com extratos da semente de *Punica granatum* podemos perceber que a quantidade encontrada neste outro vegetal é bem superior aos encontrados no presente estudo. O conteúdo encontrado em *P. granatum* variou entre 1775,4 e 3547,9 mg de equivalentes de ácido gálico/L<sup>[27]</sup>.

Estudos mostram que compostos fenólicos são constantemente associados à redução no risco de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas<sup>[23]</sup>. Estes compostos atuam por meio de outros mecanismos além da capacidade antioxidante, como a modulação da atividade de diferentes enzimas como telomerase, lipoxigenase e cicloxigenase, interações com receptores e vias de transdução de sinais, regulação do ciclo celular, entre outras, essenciais para a manutenção da homeostase dos organismos vivos<sup>[28]</sup>.

Ao analisarmos o efeito hemaglutinante, percebe-se que não houve atividade detectável. As hemaglutininas administradas por via oral têm o potencial de interagir com diferentes glicoproteínas do trato gastrointestinal, exercendo efeitos poderosos na sua estrutura, função, capacidade digestiva, condição imunológica e microbiota, podendo também influenciar no estado nutricional e na saúde humana. Além dessas propriedades, as hemaglutininas podem promover estimulação mitogênica de linfócitos e aglutinação de células cancerosas, sendo usadas como agente terapêutico contra tumores e apresentando resultados eficazes, seletivos e com menores efeitos colaterais<sup>[29,30]</sup>.

## **6 CONCLUSÃO**

De acordo com os dados encontrados e as correlações literárias, conclui-se que a semente e os molhos de mostarda apresentaram quantidades relevantes de proteínas solúveis, sendo o extrato de semente o que apresentou resultado mais significativo quando obtido com os tampões tris-glicina e tris-HCl.

Para a detecção dos inibidores de tripsina, percebe-se que houve uma forte presença de inibição tanto no extrato de semente quanto nas amostras de molho 1 e 2. Desse modo, tornou-se evidente, mais uma vez, que a semente apresentou atividade inibitória superior.

Na detecção da atividade inibitória para quimotripsina pode-se constatar que em todas as amostras, tanto de semente quanto os molhos 1 e 2 de mostarda, foi detectada inibição para quimotripsina, sendo o extrato de semente a que apresentou maior atividade, assim como para detecção da presença de compostos fenólicos, que mesmo em quantidades reduzidas, está presente na semente. Sabe-se que a presença de proteínas solúveis e compostos fenólicos em maior quantidade na semente de mostarda pode ter sido determinante para os resultados obtidos para a atividade antitriptica e anti-quimotriptica.

A presença dessas moléculas pode caracterizar a mostarda como um alimento funcional, pois as mesmas já provaram trazer benefícios à saúde, dos quais podemos destacar o efeito anti-inflamatório e ação anticarcinogênica ligados às atividades anti-quimotripticas, assim como o efeito sacietogênico diretamente relacionado com os efeitos antitripticos. Sendo também de fundamental importância para a evolução da ciência biotecnológica e farmacológica em benefício da saúde da população.

## **REFERÊNCIAS**

- 1- Tilman D, Clark M. Global diets link environmental sustainability and human health. *Nature*; 2014 Nov. 27; 515 (7528): 518-522,
- 2- Fonseca VV. Análises dos diversos tipos e seu emprego em dioterapia das doenças gastrointestinais. *Revista Nutrição Brasil*. 2004 Jul/Ago;3(4):254-60.
- 3- Bigliardi B, Galati, F.. Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. *Trends in Food Sci Technol* 2013; 31(2):118–29.

- 4- Neumann AICP, Abreu ES; Torres EAFS. Alimentos Saudáveis, Alimentos Funcionais, Fármaco Alimentos, Nutracêuticos. Você Já Ouviu Falar? *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, 2000 Abr;14(71):19-23.
- 5- Vieira SM. Biscoito tipo cookie com adição de quitosana (Dissertação). Fortaleza: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, 2001.
- 6- Traoret CJ, Lokko P, Cruz ACRF, Oliveira CG, Costa NMB, Bressan J, Alfenas RCG, Mattes RD. Peanut digestion and energy balance. *International Journal of Obesity*. 2008; 32(2):322–328.
- 7- Griel AE, Eissenstat B, Juturu V, Hsieh G, Kris-Etherton PM. Improve diet quality with peanut consumption. *J Am Coll Nutr*. 2004 Dec;23(6):660-8.
- 8- Zanini S F., Sousa, DRI, Melo, FS. "Capítulo 10-Valorização de resíduos vegetais mediante avaliação da bioatividade dos fitoconstituintes." *Bruno Borges Deminicis & Carla Braga Martins* 2014: 99.
- 9- Yuan H, Zhu M, Guo W, Jin L, Chen W, Brunk UT, Zhao M. Mustard seeds (*Sinapis Alba* Linn) attenuate azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Redox Rep*. 2011; 16(1): 38–44.
- 10- Wen C, Yang R, Hu J, Jiao Z, Yang Y, Yang J, Li H, Zhao H. Effects of mustard seed on 2, 4-dinitrofluorobenzene- induced allergic contact dermatitis in BALB/c mice. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2012 Apr; 32:569–572.
- 11- National Pharmacopoeia Committee. *Beijing*: China Medical Science Press, 2010.
- 12- Delfino RA, Canniatti-Brazaca SG. Interação de polifenóis e proteínas e o efeito na digestibilidade protéica de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Pérola. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010;30(2):308-12.
- 13- Serquiz AC. *Efeito sacietogenico de um novo inibidor de tripsina da paçoca do amendoim com aumento plasmático de colescistocinina (CCK)* (Dissertação). Natal; Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.
- 14- Lis H, Sharon N. lectin: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular. *Chemical reviews*, Columbus. 1998 Mar/Apr; 98(0):637-674.
- 15- Bradford M, Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72:248-254.
- 16- Kakade ML, Simons N, Liener IE. An evaluation of natural vs synthetic substrate for measuring the antitryptic of soybean samples. *Cereal Chemistry*, Saint Paul. 1969; 46(4):518-526.
- 17- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*. 1970; 227:680–685.

- 18- Puzstai A, Palmer R. Nutricional evaluation of Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): The toxic príncipe. *J Sci. Food Agric.*, 1977;28:620.
- 19- Swain T, Hills WE. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I - quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.*, London. 1959; 19(1):63-68.
- 20- Gaber A.; Johansson M.; Stenman U-H., Hotakainen K., Pontén F., Glimelius B.; Bjartell A.; Jirstrom, K.; Birgisson, H. High Expression of tumor-associated trypsin inhibitor correlates with liver metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2009. 100, 1540-1548.
- 21- Su SB, Motoo Y, Iovanna JL, Xie MJ, Sawabu N. Effect of camostat mesilate on the expression of pancreatitis associated protein (PAP), p8, and cytokines in rat spontaneous chronic pancreatitis. *Pancreas*, Hagerstown. 2001 Aug; 23(2):134-40.
- 22- Timothy HM, Kinzing KP. Gastrointestinal satiety signals. II. Cholecystokinin. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 2004. 286: G183-188.
- 23- Salunkhe DK, Jadhay SJ, Jadam SS, Chavan JK. Chemical, biochemical and biological significance of polyphenol in cereals and legumes. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Cleveland. 1982; 17(3):277-35.
- 24- Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000;52:481-504.
- 25- Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL., Butcher EC. *Science* 245, 1238, 1989.
- 26- Kennedy AR. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998; 68(6) Suppl: 1606S-1412S.
- 27- Gozlekçi S, Saraçoğlu O, Özgen M. Total Phenolic Distribution of juice, peel and seed extracts of four pomegranate cultivars. *Pharmacognosy Magazine*. 2011, Apr-Jun; 7(26): 161-164.
- 28- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*. 2007; 43(4): 348-61.
- 29- Liener, I. E. Factors affecting the nutritional quality of soya products. Proceedings of the World Conference on Soya Processing and Utilization. *J. Am. Oil Chem Soc.* Acapulco, Mexico, November 9-14 1980; 56:121-9.
- 30- Rabelo L, Monteiro N, Serquiz R, Santos P, Oliveira R, Oliveira A, Rocha H, Morais A. H, Uchoa A, Santos E A. Lactose-Binding Lectin from the Marine Sponge *Cinachyrella Apion* (Cal) Induces Cell Death in human Cervical Adenocarcinoma Cells. *Marine Drugs*. 2012, 10(4), 727-743.