



# PRECIPITAÇÃO DO INIBIDOR DE $\alpha$ -AMILASE DE FEIJÃO BRANCO: AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS\*

Luciana Lopes Silva PEREIRA\*\*  
Custódio Donizete dos SANTOS\*\*\*  
Chrystian Araújo PEREIRA\*\*  
Tamara Rezende MARQUES\*\*\*\*  
Lívia Cabral SÁTIRO\*\*\*\*

■ **RESUMO:** Dietas suplementadas por “starch blockers”, como são popularmente denominados os inibidores de  $\alpha$ -amilase, tem sido adotadas de forma crescente. O inibidor extraído do feijão branco diminui o conteúdo calórico fornecido pela ingestão de carboidratos por inibir a enzima  $\alpha$ -amilase. As técnicas de precipitação de proteínas em soluções aquosas, com posterior recuperação do precipitado, constituem uma das mais importantes operações unitárias de processos de recuperação e purificação destas moléculas. Neste contexto, o objetivo neste trabalho foi analisar o perfil da precipitação do inibidor de  $\alpha$ -amilase de feijão branco perante diferentes precipitantes em várias concentrações de saturação e sugerir o processo mais eficaz e vantajoso. Os resultados indicam a metodologia utilizando precipitação por pH como opção de menor custo e eficaz na precipitação do inibidor quando comparada aos precipitantes acetona, etanol e sulfato de amônio.

■ **PALAVRAS-CHAVE:** Obesidade;  $\alpha$ -amilase; precipitação; inibição.

## INTRODUÇÃO

A  $\alpha$ -amilase (1-4  $\alpha$  D-glucanglucanohidrolase, EC 3.2.1.1) está envolvida na digestão de carboidratos. Os inibidores protéicos da  $\alpha$ -amilase são amplamente distribuídos em plantas, principalmente em cereais (trigo e cevada) e feijão. O uso destes inibidores tem sido feito para redução da hiperglicemia pós-prandial como ferramenta auxiliar na busca de nutracêuticos e fitofármacos para controle da obesidade e do diabetes mellitus não insulino-dependente. Esta inibição induz tolerância aos carboidratos, saciedade, perda de peso e prolonga o esvaziamento gástrico.<sup>13</sup> De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS),<sup>8</sup> mais de 180 milhões de pessoas em todo o mundo são portadoras de *Diabetes mellitus* com provável aumento para mais que o dobro em 2030. Segundo estimativa da OMS aproximadamente 1,6 bilhões de adultos no mundo estão acima do

peso e pelo menos 400 milhões são obesos, números que poderão chegar a 2,3 bilhões e mais de 700 milhões, respectivamente, em 2015.<sup>10</sup>

Dietas suplementadas por “starch blockers”, como são popularmente denominados os inibidores de  $\alpha$ -amilase, tem sido adotadas de forma crescente. Acredita-se que o inibidor extraído do feijão branco diminua o conteúdo calórico fornecido pela ingestão de carboidratos por inibir a enzima  $\alpha$ -amilase, responsável pela conversão dos carboidratos complexos (amido) em açúcares simples e consequentemente diminuindo a absorção de açúcar no intestino delgado.<sup>3</sup>

Metodologias para purificação do inibidor foram propostas desde a década de 1980 e os processos relatados envolvem tratamento por calor, precipitação, diálise, e cromatografias de filtração molecular, troca iônica, interações hidrofóbicas e de afinidade. A etapa de preparação da amostra torna-se um desafio para obtenção de métodos mais rápidos, que utilizem menores volumes e concentração mais eficiente de proteínas inibidoras. Dentre as etapas comumente utilizadas, a precipitação de proteínas é frequentemente encontrada, devido a sua alta capacidade de concentrar a molécula de interesse e pelo seu baixo custo, estando presente em quase todos os processos de purificação.<sup>6,9,12</sup> Neste contexto, a precipitação se insere como uma etapa intermediária entre a separação inicial e uma pré-purificação, ocorrendo, geralmente, entre uma primeira etapa de separação sólido-líquido, realizada por centrifugação ou filtração, e a purificação final utilizando-se adsorção ou cromatografia.<sup>4</sup>

A precipitação de proteínas como operação unitária é projetada baseando-se tanto em sua solubilidade, um fator de equilíbrio termodinâmico, quanto em fatores cinéticos que regem a nucleação (tempo de indução) e o crescimento das partículas (cinética de crescimento e sedimentação). As técnicas de precipitação de proteínas em soluções aquosas, com posterior recuperação do precipitado, constituem uma das mais importantes operações unitárias de processos de recuperação e purificação destas moléculas. Proteínas po-

\* Trabalho elaborado com apoio financeiro da FAPEMIG.

\*\* Programa de Pós-Graduação em Química – Curso de Doutorado – Universidade Federal de Lavras – 37200-000 – Lavras – MG – Brasil. E-mail: lucianalsp@yahoo.com.br.

\*\*\* Departamento de Química – Universidade Federal de Lavras – 37200-000 – Lavras – MG – Brasil.

\*\*\*\* Curso de Graduação em Química – Universidade Federal de Lavras – 37200-000 – Lavras – MG – Brasil.

dem ser precipitadas ou cristalizadas a partir de uma variedade de sistemas de solventes, co-solventes, aditivos e modificações do ambiente físico-químico da solução. Dentre os métodos utilizados pode-se citar: adição de sais, mudança de pH e adição de solventes ou polímeros orgânicos.<sup>5</sup>

Neste contexto, o objetivo neste trabalho foi analisar o perfil da precipitação do inibidor de  $\alpha$ -amilase de feijão branco perante diferentes precipitantes em várias concentrações de saturação e sugerir um processo mais eficaz e vantajoso.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Materiais e Equipamentos

O feijão branco, cultivado na cidade de Campo Belo, MG, foi adquirido num supermercado local. Para obtenção da farinha, os grãos foram triturados em moinho manual e, em seguida num moinho de facas (TE 631 Tecnal) para obtenção de uma granulometria menor.

Os extratos foram obtidos após 15 minutos de agitação em agitador horizontal e centrifugados a 10000g em centrífuga Jouan modelo GR2022.

A enzima  $\alpha$ -amilase pancreática suína (tipo VI SIGMA) teve como substrato uma solução de amido 1%. Os ensaios de inibição enzimática foram realizados em banho-maria a 37°C.

As medidas de absorção foram feitas utilizando-se de espectrofotômetro UV/Vis Varian Cary 50.

### Preparo dos Extratos de Farinha de Feijão Branco

Os grãos com casca foram lavados com água destilada, secos em estufa com circulação de ar a 30°C até peso constante, sendo, em seguida, moídos até a obtenção de uma granulação em torno de 60 mesh, e acondicionado em frasco hermeticamente fechado, ao abrigo da luz, até a utilização nas análises.

Os extratos protéicos foram preparados em água destilada na proporção 1:5 FFB: água. O extrato foi agitado por 15 min, centrifugado a 10000g por 10 min a 4°C e o sobrenadante separado (S1). O sedimento foi novamente homogeneizado em água e centrifugado nas mesmas condições anteriores para a separação dos sobrenadantes (S2, S3 e S4). Obteve-se o sobrenadante total (St) pela mistura dos quatro sobrenadantes. O St foi colocado em banho-maria 70°C por 5 min e centrifugado a 10000g por 10 min. Foi retirada uma alíquota do sobrenadante final de St para determinação do teor protéico e para as precipitações.

### Precipitação com Adição de Sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou Solventes Orgânicos (Acetona e Etanol)

Inicialmente foram realizados estudos preliminares da precipitação das proteínas na presença de diferentes concentrações de saturação com sulfato de amônio, etanol ou acetona. Empregaram nove concentrações: 10% (m/m),

20%(m/m), 30%(m/m), 40%(m/m), 50%(m/m), 60%(m/m), 70%(m/m), 80%(m/m) e 90%(m/m). A precipitação ocorreu por uma noite, a 4°C para o sulfato de amônio e a -20°C para o etanol e a acetona. Em seguida, as frações, nas diversas concentrações de saturação de precipitante, foram centrifugadas a 10000 x g por 10 min e o precipitado contendo as proteínas foi coletado. Os precipitados provenientes do sulfato de amônio foram dialisados contra água e os provenientes da acetona e etanol foram deixados à temperatura ambiente até total evaporação dos solventes.

Os extratos aquosos contendo a proteína inibidora em cada concentração de saturação foram utilizados nas análises de teor protéico e de inibição da  $\alpha$ -amilase.

### Dialise

Após a pré-concentração das proteínas pelo sulfato de amônio, a solução do extrato (1,5mL) foi acondicionada em uma membrana semipermeável de celofane (polímero derivado da celulose) e o material foi dialisado contra 2000mL de água destilada a 4°C. A água destilada foi trocada em intervalos de 4 h, durante um período de 24h.

### Precipitação por pH

O extrato protéico, preparado conforme descrito anteriormente, apresentou um pH igual a 6,3. Para precipitação isoelétrica de proteínas interferentes os valores de pH foram ajustados como proposto por Pusztai et al.<sup>9</sup> O pH foi ajustado para 5,0 com HCl 1mol.L<sup>-1</sup> e deixado em geladeira a 4°C por uma noite com posterior centrifugação a 10000g por 10 min. Ao sobrenadante recolhido foi adicionado NaOH 1mol.L<sup>-1</sup> até o pH 9,5 e novamente colocado em geladeira por uma noite e centrifugado conforme descrito anteriormente. O sobrenadante foi recolhido e o pH foi corrigido com HCl 1mol.L<sup>-1</sup> para 6,9 para posteriores análises de inibição enzimática e teor de proteína.

### Atividade Inibitória da $\alpha$ -amilase

A atividade de amilase inibida foi determinada segundo Noelting & Bernfeld,<sup>7</sup> a partir da diferença entre a atividade na ausência, controle sem inibidor, e na presença do inibidor, após pré-incubação da enzima com o extrato protéico contendo o inibidor por 20 min a 37°C. O ensaio foi cinético, visto que em cada análise a mistura de reação foi incubada por quatro períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 min). Controles sem enzima (branco de substrato) e sem substrato (branco enzima) foram incubados do mesmo modo. A inclinação da reta (gráfico absorbância x tempo), diretamente proporcional à atividade enzimática, foi determinada e utilizada para os cálculos de inibição.

A atividade de  $\alpha$ -amilase foi expressa em unidades (U) que correspondem à formação de um  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio. 1UIA (unidade de inibição de  $\alpha$ -amilase) corresponde à inibição total de 1U de  $\alpha$ -amilase.

### Determinação da Concentração de Proteínas Totais

A quantificação das proteínas totais nos extratos foi realizada empregando-se a metodologia descrita por Bradford.<sup>1</sup> Para a obtenção da curva analítica, 0,1mL da solução padrão de proteína (40 a 200µg/mL de BSA) foi adicionadas a 2,0mL da solução do reagente (Azul Brilhante de Commassie). Após 15 min de reação a absorbância do complexo formado foi medida espectrofotometricamente em 595nm. Construída a curva analítica, adicionou-se 0,1mL do extrato bruto à solução do reagente; a absorbância do complexo formado foi medida também em 595nm depois de 15 min de reação, para determinação da concentração de proteína no extrato.

### Determinação da Atividade Inibitória Específica

A atividade inibitória específica (UIA/mg de proteína) foi calculada pela razão entre a inibição da atividade

da enzima por 1 grama de FFB (UIA/g FFB) e o teor de proteína total (mg proteína/g FFB).

### Análise Estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente mediante a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Scott Knott ao nível de 5% de significância.

## RESULTADOS

### Precipitação com Solventes Orgânicos

A precipitação do inibidor de  $\alpha$ -amilase foi maior com o aumento da concentração de solvente orgânico. A precipitação mostrou-se mais eficiente em concentrações acima de 60% de acetona (Figura 1) e 80% de etanol (Figura 2).

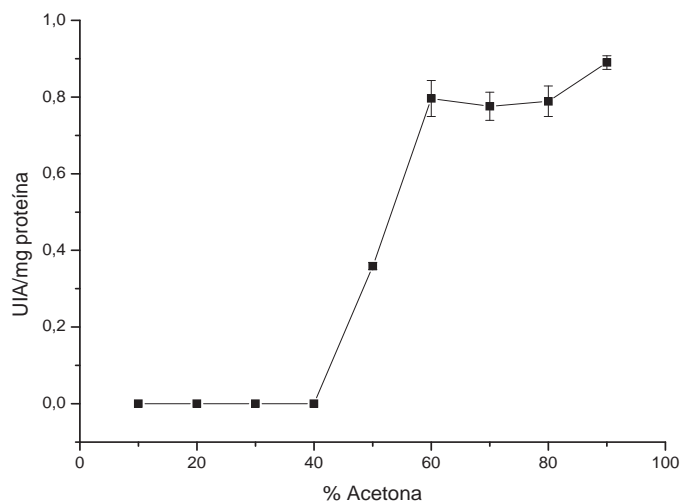


FIGURA 1 – Inibição específica (UIA/mg proteína) da  $\alpha$ -amilase pelo inibidor extraído de FFB em concentrações crescentes de acetona.

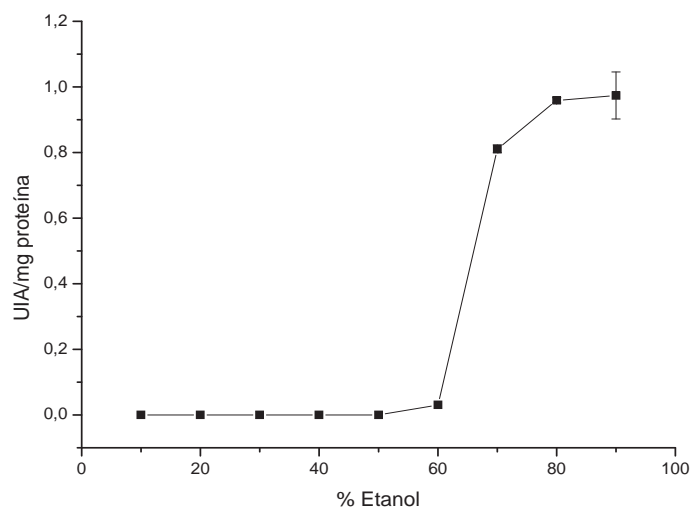


FIGURA 2 – Inibição específica (UIA/mg proteína) da  $\alpha$ -amilase pelo inibidor extraído de FFB em concentrações crescentes de etanol.

## Precipitação com Adição de Sais

A inibição específica mais elevada da  $\alpha$ -amilase foi obtida com 50% de sulfato de amônio (Figura 3).

## Precipitação por pH

A inibição específica da  $\alpha$ -amilase após precipitação do inibidor por variação do pH foi de  $2,079 \pm 0,192$ , o que demonstra eficiência no processo de precipitação.

## Comparação entre os Precipitantes

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos nos procedimentos de pré-purificação do inibidor de  $\alpha$ -amilase obtido da FFB. As porcentagens de acetona, etanol e sulfato de amônio demonstrados foram as que apresentaram maior inibição específica.

Observou-se que os maiores valores de inibição específica foram obtidos com a precipitação por pH e com sulfato de amônio com 50% de saturação, que não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

### Precipitação com Solventes Orgânicos

A literatura cita algumas teorias para elucidar o processo bioquímico de precipitação das proteínas pela adição de solventes orgânicos. Na precipitação de proteínas em soluções aquosas por adição de solventes orgânicos, a atividade química da água é reduzida conforme se aumenta a concentração do co-solvente apolar, devido principalmente ao deslocamento e à imobilização parcial das moléculas de água pela hidratação do solvente orgânico, diminuindo a capacidade de solvatação da proteína pela água. Além disso, neste tipo de sistema, a atração entre as cargas opostas das moléculas de proteína é intensificada devido à redução da constante dielétrica do meio. Com o deslocamento da estrutura ordenada de água ao redor das áreas superficiais da proteína pelo solvente orgânico, ocorre uma maior interação entre estas macromoléculas, que tendem a se agregar e precipitar.<sup>5</sup> Outros afirmam que, diferente dos processos de precipitação por “salting-out” e da precipitação isoelétrica, a precipitação por adição de solventes orgânicos

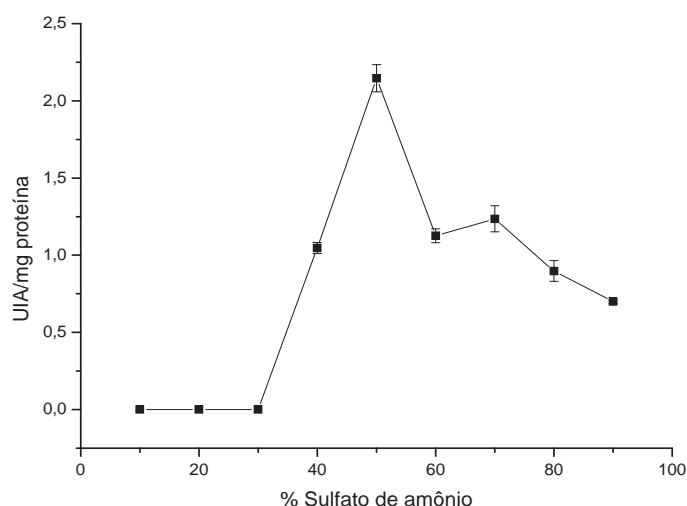


FIGURA 3 – Inibição específica (UIA/mg proteína) da  $\alpha$ -amilase pelo inibidor extraído de FFB em concentrações crescentes de sulfato de amônio.

Tabela 1 – Perfil da inibição específica da  $\alpha$ -amilase comparando-se os agentes precipitantes.

Amostra	Inibição da $\alpha$ -amilase (UIA/g FFB) *	Proteínas totais (mg/g)	Inibição específica (UIA/mg proteína) *	Fator de purificação
Extrato bruto	$66,89 \pm 7,15$	$132,62 \pm 5,3$	$0,501 \pm 0,05^c$	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50%**	$34,84 \pm 2,35$	$17,68 \pm 1,3$	$2,147 \pm 0,360^a$	3,91
pH**	$36,83 \pm 2,34$	$18,36 \pm 0,8$	$2,079 \pm 0,192^a$	3,98
Etanol 80%**	$59,95 \pm 5,44$	$64,16 \pm 3,7$	$0,959 \pm 0,036^b$	1,85
Acetona 90%**	$59,4 \pm 2,4$	$66,72 \pm 4,7$	$0,789 \pm 0,040^b$	1,76

\*Os valores com as mesmas letras sobrescritas não diferem entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Scott Knott.

\*\*Extrato obtido após precipitação.

parece ser mais direcionada pelas interações eletrostáticas entre as moléculas de proteína que pelo chamado efeito hidrofóbico.<sup>14</sup>

Dentre os solventes orgânicos utilizados, os mais citados são a acetona e o etanol, por sua completa miscibilidade na água e por não reagirem com a proteína.<sup>5</sup>

A vantagem da precipitação com acetona e com etanol é que o solvente pode ser rapidamente evaporado do sedimento à temperatura ambiente sem a necessidade de processos posteriores para remoção do precipitante. Tal processo foi utilizado por Yang et al.,<sup>15</sup> na purificação parcial e caracterização da glicoproteína inibidora da  $\alpha$ -amilase de feijão branco.

### Precipitação com Adição de Sais

A precipitação de proteínas pelo gradativo aumento da concentração de sais é um processo muito importante para a separação de misturas complexas de proteínas, uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada uma. Neste estudo, a melhor precipitação do inibidor ocorreu com 50% de sulfato de amônio. Diversos autores utilizaram uma faixa de 30 a 60% para precipitar o inibidor de  $\alpha$ -amilase de feijão branco como uma etapa prévia à purificação em coluna cromatográfica e em sistema aquoso bifásico.<sup>2</sup>

O sulfato de amônio é o sal mais utilizado em “salting-out” devido a sua alta solubilidade em água, à baixa densidade de suas soluções, à posição favorável deste íon na série de Höffmeister, à ausência de efeitos desnaturantes e ao fato de prevenir o crescimento de bactérias na solução. Apesar das vantagens inerentes à técnica, a necessidade de um tratamento da fase precipitada, para a retirada do sal e obtenção do produto desejado em maiores graus de pureza (sobretudo no caso de aplicações farmacêuticas), e por alterar as análises de inibição enzimática e tratamento da fase sobrenadante, para a recuperação do sal para sua reutilização e/ou descarte da fase líquida (de forma a evitar a contaminação ambiental), limita em parte as aplicações do processo de precipitação por “salting-out” devido ao custo destes tratamentos.

### Precipitação por pH

A precipitação por pH mostrou-se eficiente com a vantagem de não gerar resíduos e ter menor que as demais. Tal processo é bastante utilizado como etapa prévia de purificação do inibidor em coluna cromatográfica com resina de troca iônica<sup>11</sup> e de interação hidrofóbica.<sup>9</sup>

### Comparação entre os Precipitantes

Dentre as precipitações do inibidor, os melhores resultados foram verificados com adição de sulfato de amônio e por alteração de pH.

Há várias limitações relacionadas à utilização do sulfato de amônio citadas anteriormente. Neste sentido, o inibidor de  $\alpha$ -amilase de FFB obtido por precipitação va-

riando-se o pH apresenta alta inibição específica quando comparado com o extrato protéico bruto.

## CONCLUSÃO

A utilização da precipitação do inibidor de  $\alpha$ -amilase de FFB por pH configura-se como um procedimento de pré-purificação eficaz, possibilitando uma grande economia de reagentes e de tempo de análise. Este procedimento pode ser empregado como etapa preliminar na purificação em colunas cromatográficas, sistema aquoso bifásico ou como processo de pré concentração do inibidor.

PEREIRA, L. L. S.; SANTOS, C. D.; PEREIRA, C. A.; MARQUES, T. R.; SÁTIRO, L. C. Precipitation of  $\alpha$ -amylase inhibitor from white beans: evaluation of methods. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 21, n. 1, p. 15-20, jan./mar. 2010.

■ABSTRACT : Diets supplemented by “starch blockers” as they are popularly known as inhibitors of  $\alpha$ -amylase, has been increasingly adopted. It is believed that the inhibitor extracted from the beans decrease the calorie content provided by intake os carbohydrates by inhibiting the enzyme  $\alpha$ -amylase. The technique of precipitation of proteins in aqueous solutions, with subsequent recovery of the precipitate, is one of the most important unit operations in processes of recovery and purification of these molecules. In this context, the objective of this study was to analyze the precipitation inhibitor  $\alpha$ -amylase of beans with different precipitants at various concentrations of saturation and suggest the most effective and beneficial. The results indicate the method used by pH precipitation as the most inexpensive and effective in precipitating the inhibitor as compared to the precipitating acetone, ethanol and ammonium sulfate

■KEYWORDS: Obesity;  $\alpha$ -amylase; precipitation; inhibition.

## REFERÊNCIAS

1. BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
2. CHEN, X. et al. Purification of an alpha amylase inhibitor in a polyethylene glycol / fructose-1,6-bisphosphate trisodium salt aqueous two-phase system. *Process Biochem.*, v. 43, p. 765, 2008.
3. CHOKSHI, D. Subchronic oral toxicity off standardized white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) extract in rats. *Food Chem. Toxicol.*, v. 45, n. 1, p. 32-40, jan. 2007.

4. LADISCH, M. R. **Bioseparations engineering**. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. 116-151.
5. LIMA, L. H. F. **Precipitação de lisozima e insulinas bovina e suína por “salting out” com o uso de eletrólitos voláteis**. 2004. 74f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
6. MARSHALL, J. J.; LAUDA, C. M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of  $\alpha$  amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 8030-8037, 1975.
7. NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques III. La amylase: dosage d'activate et controle de l' à-amilase. **Helv. Chim. Acta**, v. 31, n. 1, p. 286-290, 1948.
8. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde**. Brasília, DF, 2003. 60 p.
9. PUSZTAI, A. et al. Inhibition of starch digestion by  $\alpha$ -amylase inhibitor reduces the efficiency of utilization of dietary proteins and lipids and retards the growth of rats. **J. Nutr.**, v. 125, n. 6, p. 1554-1562, 1995.
10. TEIXEIRA, A. P. et al. O efeito da adição de yacon no suco de laranja industrializado sobre a curva glicêmica de estudantes universitários. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 20, n. 2, p. 313-319, abr./jun. 2009.
11. TORMO, M. A. et al. Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. **Br. J. Nutr.**, v. 92, p. 785-790, 2004.
12. TORMO, M. A. et al. White bean amylase inhibitor administered orally reduces glycaemia in type 2 diabetic rats. **Br. J. Nutr.**, v. 3, p. 539-544, 2006.
13. UDANI, J. K. et al. Lowering the glycemic index of white bread using a white bean extract. **Nutr. J.**, v. 8, n. 52, p. 1-5, 2009.
14. WATANABE, E. O. **Estudo da precipitação de tripsina com uso de sais voláteis**. 2004. 113f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
15. YANG, M. Y. et al. Purification and parcial characterization of a glycoprotein  $\alpha$ -amylase inhibitor from white kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L). **J. Food Biochem.**, v. 32, n. 1, p. 72-84, fev. 2008.