



LUCIANA LOPES SILVA PEREIRA

**INIBIDORES DE ENZIMAS DIGESTIVAS DO
FEIJÃO BRANCO: ISOLAMENTO, ATIVIDADE
BIOLÓGICA E PERSPECTIVAS PARA O
TRATAMENTO DA OBESIDADE E DO
DIABETES MELLITUS**

LAVRAS-MG

2011

LUCIANA LOPES SILVA PEREIRA

**INIBIDORES DE ENZIMAS DIGESTIVAS DO FEIJÃO BRANCO:
ISOLAMENTO, ATIVIDADE BIOLÓGICA E PERSPECTIVAS PARA O
TRATAMENTO DA OBESIDADE E DO DIABETES MELLITUS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Custódio Donizete dos Santos

**LAVRAS-MG
2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Pereira, Luciana Lopes Silva.

Inibidores de enzimas digestivas do feijão branco : isolamento, atividade biológica e perspectivas para o tratamento da obesidade e do diabetes mellitus / Luciana Lopes Silva Pereira. – Lavras : UFLA, 2011.

136 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Custódio Donizete dos Santos.

Bibliografia.

1. Inibidor de α amilase. 2. Atividade anti-diabetogênica. 3. Avaliação toxicológica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD –574.19254

LUCIANA LOPES SILVA PEREIRA

**INIBIDORES DE ENZIMAS DIGESTIVAS DO FEIJÃO BRANCO:
ISOLAMENTO, ATIVIDADE BIOLÓGICA E PERSPECTIVAS PARA O
TRATAMENTO DA OBESIDADE E DO DIABETES MELLITUS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 08 de abril de 2011.

Profa. Dra. Silvana Marcussi UFLA

Prof. Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima UFLA

Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa UFLA

Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS –MG
2011**

*Dedico este trabalho aos maiores incentivadores de tudo que realizo na vida:
minha família.*

*Aos meus pais, que com seus exemplos,
ensinaram - me a perseverar
e a valorizar as oportunidades.
Aprendi com meu pai, Vicente, a ser firme,
correta e a não desistir perante as dificuldades.
Com minha mãe, Mariana, a ter fé, paciência e doçura ao tratar as pessoas.*

*Em especial, ao Chrystian, meu esposo e ETERNO amor.
“Sim, meu amor por ti já estava em mim, antes que te conhecesse.
Então, eu te conhecia sem o saber!
Agora, que te encontrei, re-conheci o rosto que eu já amava sem saber.
Tu já existias em mim desde antes do começo dos mundos,
morando numa memória anterior à história!”
(Adaptado de Rubem Alves)*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Expresso minha gratidão a todos que fizeram parte deste trabalho e contribuíram para o sucesso desta jornada.

A Deus, por guiar a minha vida e proporcionar possibilidades nos momentos mais difíceis.

Ao professor Custódio Donizete dos Santos, pela orientação e por ter acreditado no propósito deste trabalho.

À professora Silvana Marcussi, pela generosidade em compartilhar suas experiências, pela confiança, incentivo e pelo constante espírito de colaboração.

Ao professor Luiz Carlos de Oliveira Lima pela disponibilidade e direcionamento, e ao Dr. Marcelo Murad Magalhães, pelo acompanhamento nas análises de cromatografia.

Às professoras Lisete Chamma Davide e Larissa Fonseca Andrade, pelo apoio nas etapas de coloração e observação microscópica das lâminas do ensaio do Cometa.

Ao professor Raimundo Vicente de Sousa, por quem tenho profunda admiração. Agradeço pela presença constante na minha vida profissional, pelo apoio, pela gentileza e presteza em disponibilizar o biotério e orientar a execução das análises do ensaio biológico.

Ao amigo Willian César Cortez, funcionário do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia (DMV), que com sua competente participação e instrução no ensaio biológico, foi essencial à realização deste trabalho.

Às amigas Clarissa Ferreira de Moraes pelo auxílio na condução do ensaio biológico e Tamara Rezende Marques nas inibições enzimáticas.

A todos os colegas de pós-graduação, que compartilharam comigo este caminho, especialmente à Maria Cristina Silva, uma pessoa rara e amiga verdadeira.

À amiga Stefânia Priscilla de Souza, pela participação fundamental nas análises e por compartilhar o entusiasmo e o idealismo que nos caracterizam.

À filha científica e amiga Lívia Cabral Sátiro, pela dedicação e responsabilidade demonstradas em todas as etapas deste trabalho.

Ao professor Chrystian Araujo Pereira, por auxiliar-me em toda a pesquisa, desde a execução das técnicas à correção dos manuscritos. Agradeço pelo apoio profissional e pela oportunidade de crescermos juntos.

Finalmente, à FAPEMIG, pela bolsa e pelo apoio financeiro ao projeto.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 Introdução Geral	1
1.1 Objetivo geral	2
1.2 Objetivos específicos	2
2 Revisão de Literatura	3
2.1 Prevalência e impacto econômico e social da diabetes	3
2.2 Carboidratos	5
2.2.1 Amido	5
2.2.2 Digestão e absorção	9
2.3 Mecanismos de hidrólise da ligação glicosídica	11
2.4 Alfa amilase	12
2.5 Inibição da α -amilase	15
2.5.1 Inibidor de α -amilase de feijão branco	17
2.6 Efeitos fisiológicos do inibidor de α -amilase de feijão branco	19
2.7 Antinutrientes e feijão branco	20
2.8 Perspectivas dos estudos do α -AI de feijão branco	22
2.9 Considerações finais	22
3 Referências Bibliográficas	23
ARTIGO 1 Padronização da extração do inibidor protéico de α -amilase de feijão branco	27
1 Resumo	27

2 Summary	27
3 Introdução	28
4 Parte experimental	29
4.1 Materiais e equipamentos	29
4.2 Preparo dos extratos de FFB	29
4.3 Condições de extração	30
4.4 Ensaio de inibição da α -amilase	30
4.5 Determinação da atividade inibitória específica	31
4.6 Análise estatística	31
5 Resultados e discussão	32
5.1 Condições de extração	32
5.1.1 Comparação entre os extratores	32
5.1.2 Influência do tempo de agitação	33
5.1.3 Influência da proporção de extrator	34
5.1.4 Influência do tempo de exposição a temperatura de 70°C	35
6 Conclusão	37
7 Bibliografia citada	38
ARTIGO 2 Precipitação do inibidor de α -amilase de feijão branco: avaliação dos métodos	40
1 Resumo	40
2 Introdução	41
3 Material e Métodos	43
3.1 Materiais e Equipamentos	43
3.2 Preparo dos extratos de farinha de feijão branco	43
3.3 Precipitação com adição de sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou solventes orgânicos (acetona e etanol)	44

3.4 Diálise	44
3.5 Precipitação isoelétrica por variação de pH	45
3.6 Atividade Inibitória da α -amilase	45
3.7 Determinação da concentração de proteínas totais	46
3.8 Determinação da atividade inibitória específica	46
3.9 Análise estatística	46
4 Resultados	47
4.1 Precipitação com solventes orgânicos	47
4.2 Precipitação com adição de sais	48
4.3 Precipitação isoelétrica por variação de pH	48
4.4 Comparação entre os precipitantes	48
5 Discussão	50
5.1 Precipitação com solventes orgânicos	50
5.2 Precipitação com adição de sais	51
5.3 Precipitação isoelétrica por variação de pH	51
5.4 Comparação entre os precipitantes	52
6 Conclusão	53
7 Abstract	54
8 Referências	55
ARTIGO 3 Purificação parcial do inibidor de α -amilase extraído da farinha de feijão branco.	57
1 Resumo	57
2 Abstract	57
3 Introdução	58
4 Material e Métodos	60
4.1 Obtenção da farinha de feijão branco (FFB)	60

4.2 Atividade das enzimas	60
4.3 Atividade de α -amilase	60
4.4 Atividade de tripsina	60
4.5 Determinação da inibição	60
4.6 Meios alternativos de purificação	62
4.6.1- 1ª via de purificação: Tratamento térmico e com variação de pH	62
4.6. 2- 2ª via de purificação: Precipitação diferencial	63
4.6.3- 3ª via de purificação: Cromatografia de exclusão	63
4.6.4- 4ª via de purificação: Irradiação	64
5 Resultados e Discussão	66
5.1- 1ª via de purificação: Tratamento térmico e com variação de pH	66
5.2- 2ª via de purificação: Precipitação diferencial	68
5.3- 3ª via de purificação: Cromatografia de exclusão	69
5.4- 4ª via de purificação: Irradiação	73
6 Conclusões	76
7 Referências	77
ARTIGO 4 Ação inibitória e estabilidade do extrato de farinha de feijão branco sobre enzimas digestivas na presença de fluido gástrico simulado	81
1 Resumo	82
2 Abstract	82
3 Introdução	83
4 Material e Métodos	85
4.1 Obtenção da farinha de feijão branco (FFB) e preparo do extrato	85
4.2 Obtenção das enzimas	85
4.3 Atividade das enzimas glicolíticas	86
4.3.1 Atividade de α -amilase	86

4.3.2 Atividade de α -glicosidase	86
4.3.3 Atividade de lipase	86
4.4 Determinação da inibição	87
4.5 Fluido gástrico simulado	87
4.6 Atividade hemolítica	88
5 Resultados e Discussão	89
5.1 Atividade das enzimas glicolíticas e da lipase na presença do extrato bruto de FFB	89
5.2 Avaliação toxicológica preliminar	93
6 Conclusões	95
7 Referências	96
ARTIGO 5 Aplicação do teste do cometa para avaliar os efeitos da farinha de feijão branco sobre o DNA de linfócitos humanos	100
1 Resumo	100
2 Abstract	101
3 Introdução	102
4 Material e Métodos	105
4.1 Preparo da farinha de feijão branco (FFB)	105
4.2 Preparo dos tratamentos	105
4.3 Teste do Cometa	106
4.4 Análise estatística	107
5 Resultados e Discussão	108
6 Conclusão	113
7 Referencial bibliográfico	114
ARTIGO 6 Investigação terapêutica e toxicológica da administração de farinha de feijão branco em ratos wistar.	117

1	Resumo	117
2	Abstract	118
3	Introdução	119
4	Material e Métodos	121
4.1	Material	121
4.1.1	Equipamentos	121
4.1.2	Obtenção da farinha de feijão branco (FFB)	121
4.1.3	Animais	122
4.2	Procedimentos Experimentais	122
4.2.1	Indução do diabetes	122
4.2.2	Administração do tratamento	123
4.2.3	Coleta de dados	124
4.2.4	Análises laboratoriais do sangue	124
4.2.5	Análises laboratoriais das fezes	125
4.2.6	Histopatologia	125
4.3	Delineamento experimental e análise estatística	126
5	Resultados e Discussão	127
5.1	Indução de diabetes e efeito hipoglicêmico	127
5.2	Parâmetros fisiológicos	128
5.3	Parâmetros bioquímicos	131
5.4	Marcadores enzimáticos	133
5.4.1	Enzimas hepáticas	133
5.4.2	Enzima pancreática	134
5.5	Peso dos órgãos	136
5.6	Exame histológico	136

6 Conclusões	139
7 Referências Bibliográficas	140
Anexos	143

LISTA DE FIGURAS

	Página
REVISÃO DE LITERATURA	
FIGURA 1 Estrutura da amilose e da amilopectina	7
FIGURA 2 Classificação das cadeias da amilopectina em tipo A, B e C.	8
FIGURA 3 Mecanismos I e II propostos para clivagem da ligação glicosídica pela ação de glicosidases.	11
FIGURA 4 Formação de carbocátion (A) e íon oxocarbênio (B) durante a clivagem da ligação glicosídica pela ação de glicosidases	12
FIGURA 5 Estrutura terciária da α -amilase pancreática.	14
ARTIGO 1 Precipitação do inibidor de α -amilase de feijão branco: avaliação dos métodos	
FIGURA 1 Inibição específica (UIA/mg proteína) da α -amilase pelo inibidor extraído de FFB em concentrações crescentes de acetona	47
FIGURA 2 Inibição específica (UIA/mg proteína) da α -amilase pelo inibidor extraído de FFB em concentrações crescentes de etanol.	47
FIGURA 3 Inibição específica (UIA/mg proteína) da α -amilase pelo inibidor extraído de FFB em concentrações crescentes de sulfato de amônio.	48

ARTIGO 3 Purificação parcial do inibidor de α -amilase extraído da farinha de feijão branco.

- FIGURA 1 Vias de purificação do inibidor de α -amilase de farinha de feijão branco 62
- FIGURA 2 Perfil da porcentagem de inibição das enzimas tripsina e de α -amilase por inibidores do EBFFB, precipitados por acetona, etanol e sulfato de amônio em 9 concentrações. 68
- FIGURA 3 Perfil cromatográfico do Blue dextran (PM 2000 KDa) na concentração de 2mg/mL aplicado na coluna Sephacryl HR300 (16X60cm) 69
- FIGURA 4 Perfil cromatográfico da eluição de proteínas a 280nm da solução de FFB aplicada na coluna Sephacryl HR300 (16X60cm). 70
- FIGURA 5 Porcentagem de inibição da α -amilase nas frações coletadas por cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl HR300 (16X60cm). 72

ARTIGO 4 Purificação parcial do inibidor de α -amilase extraído da farinha de feijão branco.

- FIGURA 1 Atividade da α -glicosidase na ausência do EBFFB (controle) e na presença do EBFFB com e sem exposição ao fluido gástrico simulado. 91
- FIGURA 2 Atividade da α -amilase na ausência do EBFFB (controle) e na presença do EBFFB com e sem exposição ao fluido gástrico simulado. 92

ARTIGO 5 Aplicação do teste do cometa para avaliar os efeitos da farinha de feijão branco sobre o dna de linfócitos humanos

FIGURA 1 Freqüência de dano (FD) no DNA de linfócitos 110
humanos tratados com diferentes concentrações de FFB.

FIGURA 2 Fotomicrografias de nucleóides de linfócitos 112
humanos corados com iodeto de propídio. Aumento de 200x

ARTIGO 6 Investigação terapêutica e toxicológica da administração de farinha de feijão branco em ratos wistar.

FIGURA 1 Curva de crescimento dos ratos, durante os 21 128
dias de experimento.

FIGURA 2 Fotomicrografias (esquerda grupo controle e 137
direita grupo tratado) na ordem: rim, coração, pâncreas, intestino e fígado, utilizando coloração HE com aumento de 400x.

LISTA DE TABELAS

	Página
ARTIGO 1 Precipitação do inibidor de α -amilase de feijão branco: avaliação dos métodos	
TABELA 1 Inibição da α -amilase em unidades de inibição (UIA/g) por diferentes extratos de FFB	32
TABELA 2 Inibição da α -amilase em unidades de inibição (UIA/g) por extratos aquosos de FFB obtidos em diferentes tempos	33
TABELA 3 Inibição da α -amilase em unidades de inibição (UIA/g) por extratos aquosos de FFB em diversas proporções e 3 re-extrações.	34
TABELA 4 Inibição da α -amilase (UIA/g) pelo extrato de FFB e extrato de FFB deixado a 70°C por 5 períodos de tempo.	35
ARTIGO 2 Precipitação do inibidor de α -amilase de feijão branco: avaliação dos métodos	
TABELA 1 Perfil da inibição específica da α -amilase comparando-se os agentes precipitantes.	49
ARTIGO 3 Purificação parcial do inibidor de α -amilase extraído da farinha de feijão branco	
TABELA 1 Porcentagem de inibição da α -amilase após tratamentos térmicos por 15 minutos do EBFFB extraído em diferentes pHs e diluídos 1:10.	66
TABELA 2 Porcentagem de inibição da tripsina após tratamentos térmicos por 15 minutos do EBFFB extraído em diferentes pHs e diluídos 1:10.	67

TABELA 3	Etapas da purificação parcial do inibidor de α -amilase da farinha de feijão branco.	73
TABELA 4	Efeito da irradiação- γ na inibição de α -amilase e tripsina por extrato de farinha de feijão branco.	74
ARTIGO 4	Ação inibitória e estabilidade do extrato de farinha de feijão branco sobre enzimas digestivas na presença de fluido gástrico simulado	
TABELA 1	Inibição das enzimas digestivas α -amilase, α -glicosidase e lipase pelo extrato bruto de FFB, com ou sem incubação do extrato com fluido gástrico simulado	89
ARTIGO 5	Aplicação do teste do cometa para avaliar os efeitos da farinha de feijão branco sobre o dna de linfócitos humanos	
TABELA 1	Média do número de células por classe de cometa após tratamento com diferentes concentrações de solução aquosa de farinha de feijão branco (FFB).	111
ARTIGO 6	Investigação terapêutica e toxicológica da administração de farinha de feijão branco em ratos wistar.	
TABELA 1	Consumo médio diário de ração, água, volume de urina, e coeficiente de eficiência alimentar durante os 21 dias do experimento, para os grupos controle e tratado.	129
TABELA 2	PH, umidade e proporção (%) de nutrientes excretados nas fezes secas pelos ratos nos grupos controle e tratado.	130
TABELA 3	Níveis sanguíneos médios de colesterol total e frações nos grupos controle e tratado.	132
TABELA 4	Níveis sanguíneos médios de marcadores enzimáticos nos grupos controle e tratado	133

RESUMO

Os índices de obesidade e diabetes são preocupantes. No Brasil, estima-se que 40% da população adulta possuam excesso de peso. Daí a necessidade de adjuvantes que possam auxiliar na perda de peso e na diminuição da glicemia. O inibidor de α -amilase apresenta-se como uma alternativa promissora por interferir na digestão e conseqüentemente na absorção de carboidratos provenientes da dieta. Tal inibição resulta em diminuição da disponibilidade calórica e da glicemia pós prandial. O feijão branco é a principal fonte de inibidores protéicos de α -amilase (α -AI). Desta forma, objetivou-se neste trabalho padronizar a extração e avaliar os métodos de precipitação α -AI do feijão branco, além de testar vias alternativas de purificação. Adicionalmente, foram realizados ensaios para verificar a ação inibitória e estabilidade do extrato de farinha de feijão branco (FFB) sobre enzimas digestivas na presença de fluido gástrico simulado e a possível toxicidade pelo teste do Cometa. *In vivo*, foi realizado um ensaio biológico utilizando ratos Wistar diabéticos como modelo experimental para avaliação da eficácia e da segurança decorrentes da administração de FFB por 21 dias. Os resultados obtidos indicaram a água como extrator, na proporção de 1:5, seguida de 3 re-extrações sob agitação por 15 minutos e tratamento a 70°C por 5 minutos, como opção mais rápida e eficaz. Dentre as precipitações do inibidor os melhores resultados foram verificados com adição de sulfato de amônio e por alteração de pH. A utilização da precipitação do α -AI de FFB por pH configura-se como o melhor procedimento de pré purificação, possibilitando uma grande economia de reagentes e de tempo de análise. Na tentativa de purificação do α -AI por vias alternativas, nenhuma eliminou a inibição da tripsina. Verificando-se a estabilidade da molécula no processo de digestão, após a simulação do fluido gástrico, as enzimas α -amilase e α -glicosidase foram inibidas pela FFB. Adicionalmente, não foi verificada ação hemolítica nos ensaios preliminares de toxicidade. Utilizando o teste do Cometa foi possível observar que as doses de FFB testadas não foram genotóxicas considerando as 4 horas em que as células foram submetidas a presença dos tratamentos. Os resultados obtidos no ensaio realizado com os ratos mostraram uma tendência à diminuição da glicemia a partir de 20 dias de tratamento. No entanto, os níveis séricos de amilase mostraram-se diminuídos, o que pode estar relacionado à ocorrência de danos acinares não confirmados pela histologia em microscopia óptica.

Palavras-chave: Feijão branco. Inibidor de α -amilase. Atividade anti-diabetogênica. Avaliação toxicológica.

*Orientador: Prof. Custódio Donizete dos Santos – UFLA.

ABSTRACT

The rates of obesity and diabetes are worrying. In Brazil, it is estimated that 40% of adults have excess weight. Hence the need for adjuvants that can assist in weight loss and reduction in blood glucose. The α -amylase inhibitor is presented as a promising alternative because it interferes with digestion and thus absorption of carbohydrates from the diet. Such inhibition results in decreased availability of calories and postprandial blood glucose. The white bean is the main source of α -amylase inhibitors protein (α -AI). Thus, this study aimed to standardize the extraction and precipitation methods to evaluate the α -AI from white beans, and to test alternative ways of purification. Additionally, tests were conducted to verify the stability and inhibitory activity of the extract of white bean flour (WBF) on digestive enzymes in the presence of simulated gastric fluid and the possible toxicity of the Comet test. In vivo, an assay was performed using Wistar diabetic rats as an experimental model to evaluate the efficacy and safety from the administration of WBF for 21 days. The results showed that the water as extractor, the rate 1:5, followed by three re-extractions under stirring for 15 minutes and treatment at 70 ° C for 5 minutes, as faster and more effective option. Among the precipitation the best results were obtained with addition of ammonium sulfate and pH change. The use of the precipitation of α -AI of WBF for pH appears as the best pre-purification procedure, allowing a great economy of reagents and analysis time. In an attempt to purify the α -AI by alternative pathways, none eliminated the inhibition of trypsin. Verifying the stability of the molecule in the process of digestion, after simulation of gastric fluid, the enzymes α -amylase and α -glucosidase was inhibited by the WBF. Additionally, there was no hemolytic toxicity in preliminary tests. In preliminary tests of cytotoxicity for Comet, doses for WBF tested were not genotoxic considering the 4 hours when cells were subjected to the presence of treatments. The results obtained with the assay with rats showed that despite the trend to decrease blood glucose before 20 days of treatment, no significant decrease during the period evaluated in the treated group. However, serum levels of amylase were shown decreased. This may be related to the occurrence of cell damage in the pancreas, unconfirmed by histological analysis with optical microscopy.

Keywords: White beans. α -amylase inhibitor. Anti-diabetogenic activity. Toxicological assessment.

*Adviser: Prof. Custódio Donizete dos Santos – UFLA

1 INTRODUÇÃO

A prevalência da obesidade tem aumentado progressivamente e seu tratamento é imprescindível, pois ela está associada ao aparecimento de diversas doenças crônicas, principalmente o diabetes mellitus tipo 2.

Apesar de ser uma das enfermidades metabólicas mais antigas da humanidade, as opções farmacológicas para tratamento da obesidade são limitadas e apresentam diversos efeitos colaterais. O uso de medicamentos deve sempre visar o auxílio no processo de mudança de estilo de vida e facilitar a adaptação às mudanças dietéticas. Assim, a farmacoterapia deve servir como auxiliar no controle dietético e não como estrutura fundamental do tratamento da obesidade.

A existência de mitos e fantasias a respeito de medicamentos é muito comum. Para muitos indivíduos, tratamentos farmacológicos, em especial com produtos ditos “naturais”, constituem a melhor solução para seus males, na crença de que estes possuem os efeitos desejados sem a presença de efeitos colaterais. Vale à pena salientar que o uso pode não ser eficaz, nem destituído de riscos.

Desta forma, os fitoterápicos são amplamente utilizados para a redução de peso e da hiperglicemia, porém, por não se tratar de substâncias purificadas, os efeitos do uso dessas formulações são desconhecidos. Grande parte dos medicamentos ditos “naturais” não possui estudos que justifiquem seu uso. Pesquisas cuidadosas são necessárias para a verificação da eficácia e da segurança. Possíveis malefícios são decorrentes, principalmente, da presença de fatores antinutricionais, como inibidores enzimáticos, hemaglutininas, fitatos, e saponinas, entre outros.

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos mais importantes componentes da dieta alimentar do brasileiro e matéria prima para obtenção da

faseolamina (inibidor de α amilase). Os inibidores da enzima α -amilase, extraídos do feijão, com efeitos na inibição da digestão e absorção do amido como complementadores de dietas para perda de peso e efeito hipoglicemiante em pacientes portadores de diabetes mellitus não-insulino dependentes (DM 2), é de grande valia, dada a necessidade de alternativas terapêuticas.

1.1 Objetivo geral

Padronizar a extração e sugerir processos de desnaturação dirigida e/ou métodos para purificação em grande escala do inibidor de α amilase extraído do feijão branco como alternativas aos processos preconizados com o objetivo de obter maior rendimento e menor custo operacional e avaliar os efeitos da administração da farinha de feijão branco em ratos wistar diabéticos.

1.2 Objetivos específicos

- 1 – Padronizar a extração e isolar o inibidor de α -amilase de farinha de feijão branco.
- 2 – Avaliar a estabilidade de inibidores de enzimas digestivas presentes na farinha de feijão branco frente ao fluido gástrico simulado.
- 3 – Avaliar a toxicidade *in vitro* por meio de triagem por hemólise radial e teste do Cometa e *in vivo* por dosagens bioquímicas sanguíneas e de análises histopatológicas utilizando ratos wistar diabéticos como modelo experimental.
- 4 – Avaliar o uso da farinha de feijão branco levando-se em consideração a presença dos fatores antinutricionais com relação à dose e os riscos/benefícios da ingestão destas substâncias.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Prevalência e impacto econômico e social da diabetes.

Um balanço energético positivo resultante da disparidade entre a disponibilidade e o consumo de energia pelo organismo leva ao ganho de peso, e eventualmente, à obesidade. Atualmente, a tendência global no ganho de peso representa uma grande ameaça à saúde mundial. Adiposidade (sobrepeso e obesidade) constitui um fator de risco para uma variedade de doenças crônicas e distúrbios como dislipidemia, hipertensão arterial, diabetes tipo II, doenças cardiovasculares, osteoartrite e alguns tipos de câncer (Tucci et al., 2010).

A obesidade propicia o aumento de casos novos de diabetes e o risco de mortalidade por problemas cardiovasculares. O agravante é que em indivíduos obesos, a presença de diabetes adiciona um risco maior à doença coronariana (Tucci et al., 2010).

O diabetes mellitus (DM) é uma condição na qual o organismo perdeu, parcialmente, o poder de metabolizar os açúcares fornecidos pelos alimentos ingeridos. Como resultado, ocorre a hiperglicemia (Negri, 2005).

A maior incidência de diabetes é a do tipo 2, na qual o organismo não produz insulina em quantidades suficientes para controlar a glicemia, ou as células do corpo não são capazes de responder normalmente ao hormônio. O diabetes tipo 2 acomete, em geral, adultos com mais de 40 anos, mas está se tornando cada vez mais comum entre pessoas mais jovens. Como aconteceu com a obesidade, a incidência do diabetes atinge proporções epidêmicas. E os dois males guardam uma funesta relação, tanto que especialistas criaram o neologismo "diabetesidade": O excesso de peso e a obesidade são os principais fatores de risco modificáveis do diabetes tipo 2 (Natércia, 2010).

Uma associação positiva entre obesidade e risco de desenvolvimento de DM tipo II tem sido recorrentemente observada em estudos transversais e prospectivos. O risco de desenvolver DM cresce continuamente com o aumento do índice de massa corporal (IMC) e da idade. Na presença de um IMC acima de 22, o risco de diabetes aumenta 25% para cada elevação de 1,0 kg/m². Além disso, o risco para o desenvolvimento de complicações crônicas está diretamente associado à elevação no IMC. Dos indivíduos acometidos pelo diabetes, 80 a 90% têm excesso de peso (Oliveira et al., 2010).

Em 2005, a Organização Mundial da Saúde (OMS) informou que 1,6 bilhões de adultos foram classificados com sobrepeso, enquanto que pelo menos 400 milhões foram considerados obesos. A OMS prevê que para os próximos dez anos, um aumento de 100% das taxas globais de sobrepeso e obesidade, e em 2015, haveria cerca de 2,3 bilhão de adultos com sobrepeso e 700 milhões com obesidade (Tucci et al., 2010). Já para o diabetes, segundo projeção da Federação Internacional de Diabetes, sediada em Bruxelas (Bélgica), em 2025 o número de portadores dessa doença deverá atingir a marca de 350 milhões (Natércia, 2010).

Estratégias para perda de peso e controle da glicemia normalmente envolvem uma combinação de mudanças dietéticas limitando a ingestão calórica, aumento da atividade física, terapia comportamental, farmacoterapia, e, em casos extremos, cirurgia. Embora a popularidade da dieta natural e a disponibilidade de suplementos destinados a perda de peso tenham aumentado drasticamente nos últimos anos, a sua terapêutica e eficácia ainda são incertas em muitos casos (Celleno et al., 2007).

Muitas espécies de plantas têm sido usadas etnofarmacologicamente ou experimentalmente para auxiliar o tratamento do diabetes. Algumas substâncias podem ter potencial terapêutico, enquanto outras podem produzir hipoglicemia

como efeito colateral devido à sua toxicidade, especialmente hepatotoxicidade (Negri, 2005).

Pesquisas de drogas que atuem fornecendo uma alternativa viável para controle do peso e diminuição da glicemia com abordagens farmacológicas que auxiliem o tratamento da obesidade e do diabetes têm sido bem-sucedidas, especialmente quando trata-se de moléculas que afetem a absorção ou a disponibilidade dos nutrientes. Neste contexto, destaca-se o inibidor da α -amilase, por interferir na digestão de carboidratos provenientes da dieta.

2.2 Carboidratos

Carboidratos são as moléculas orgânicas mais abundantes na natureza. Certos carboidratos, como o açúcar comum (sacarose) e o amido, são a base da dieta na maior parte do mundo e sua oxidação é a principal via metabólica fornecedora de energia para as células. Estruturalmente, podem ser classificados em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. O amido é a fonte mais importante de carboidratos na alimentação humana, representando 80-90% de todos os polissacarídeos da dieta, e o principal responsável pelas propriedades tecnológicas que caracterizam grande parte dos produtos processados (Nelson et al., 2007).

2.2.1 Amido

Estruturalmente, o amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4. Já a amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em α -1,4 e α -1,6, formando uma estrutura ramificada. As proporções em que essas estruturas aparecem diferem em relação às fontes

botânicas, variedades de uma mesma espécie e, mesmo numa mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta (Eliasson, 2004).

Formas moleculares

Amilose

A amilose é um polímero essencialmente linear, formado por unidades de α -D-glicopirranose ligadas em α -1,4, com poucas ligações α -1,6, entre 0,1% e 2,2%. (Figura 1A). Essa molécula possui número médio de grau de polimerização de 500-5000 unidades de resíduos de glicose (Eliasson, 2004). O peso molecular é da ordem de 250.000 Daltons (1500 unidades de glicose), mas varia muito entre as espécies de plantas e dentro da mesma espécie, dependendo do grau de maturação. Moléculas de amilose de cereais são geralmente menores do que aquelas de outras origens (ex. tubérculos e leguminosas) (Denardin & Silva, 2009).

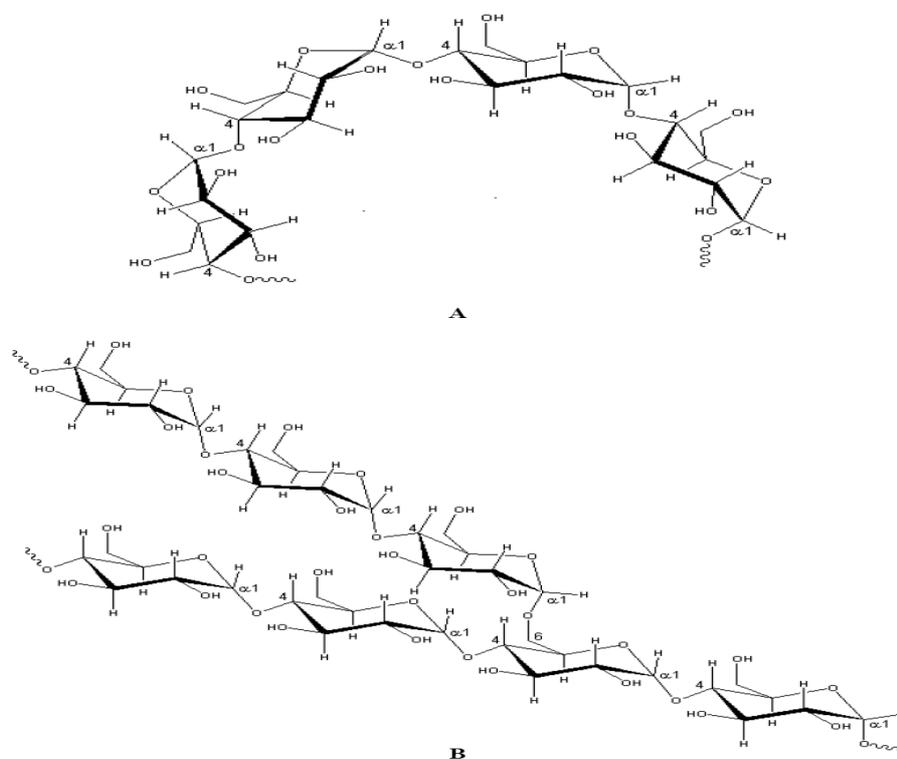


FIGURA 1A) Estrutura da amilose. B) Estrutura da amilopectina. Adaptado de Lajolo & Menezes (2006).

Amylopectina

A amilopectina é o componente ramificado do amido. Ela é formada por cadeias de resíduos de α -D-glicopiranosose unidos em α -1,4, sendo fortemente ramificada (uma ramificação a cada 17 a 25 unidades), com 4% a 6% das ligações α -1,6 (Figura 1B) (Lajolo & Menezes, 2006).

A amilopectina apresenta um grau de polimerização de 4700 a 12800 unidades de resíduos de glicose. As cadeias individuais podem variar entre 10 e 100 unidades de glicose. A amilopectina é digestivamente degradada pela ação da α -amilase nas uniões α -1-4, produzindo dextrinas α -limite (cadeias residuais que contém os pontos de ramificação) e, posteriormente, por ação das enzimas pululanase e isoamilase que atuam nas ligações α -1-6, produzindo maltose

(Denardin & Silva, 2009). As cadeias de amilopectina estão organizadas de maneiras diferentes, sugerindo uma classificação de cadeias A, B e C (Figura 2). O tipo A é composto por uma cadeia não-redutora de glicoses unidas por ligações α -1,4 sem ramificações, sendo unida a uma cadeia tipo B por meio de ligações α -1,6. As cadeias do tipo B são compostas por glicoses ligadas em α -1,4 e α -1,6, contendo uma ou várias cadeias tipo A e podem conter cadeias tipo B unidas por meio de um grupo hidroxila primário. A cadeia C é única em uma molécula de amilopectina, sendo composta por ligações α -1,4 e α -1,6, com grupamento terminal redutor (Lajolo & Menezes, 2006).

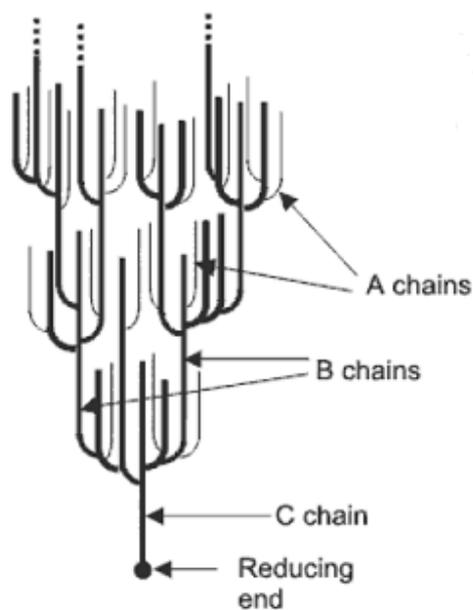


FIGURA 2 Classificação das cadeias da amilopectina em tipo A, B e C. Denardin & Silva, 2009.

2.2.2 Digestão e absorção

Nos seres humanos, entre 40% e 80% da ingestão calórica total é representada por carboidratos em suas diversas formas, sendo a fonte de energia mais importante. Segundo a estrutura química, os carboidratos podem ser classificados nas formas de absorção como absorvíveis, digeríveis, fermentáveis e não fermentáveis. Carboidratos absorvíveis (monossacarídeos, compreendendo uma única unidade, como a glicose, galactose, frutose, xilose e ribose), por definição, não precisam ser digeridos para serem transportados para o sangue. No entanto, uma vez que um carboidrato compreenda duas ou mais unidades, necessita ser digerido enzimaticamente para que seja absorvido (Englyst & Englyst, 2005).

Na dieta humana, os principais carboidratos digeríveis são dissacarídeos, tais como sacarose (açúcar comum) e lactose (açúcar do leite), e polissacarídeos maiores, como os amidos, que constituem a principal fonte de carboidratos na maioria das dietas ocidentais. Em contraste, carboidratos fermentáveis não podem ser digeridos e as enzimas não podem quebrar facilmente as ligações glicosídicas. No entanto, no cólon, esses carboidratos são facilmente metabolizados pelas bactérias através do processo de fermentação. Da mesma forma, se os carboidratos de fácil digestão, como a sacarose e lactose forem mal digeridos ou mal absorvidos, eles também serão fermentados no intestino grosso. Os produtos finais principais da fermentação de carboidratos são ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) e gases (dióxido de carbono, hidrogênio e metano) (Cummings et al., 2001). Eles podem ser absorvidos no intestino grosso (fornecendo energia), usados como substratos pelas bactérias, liberados como flatos, ou excretados na forma de biomassa nas fezes. Alguns carboidratos (tais como os componentes da parede da célula vegetal) não são digeridos/absorvidos nem fermentados. Eles passam através do trato

gastrointestinal (GI) na maior parte inalterados e são eliminados nas fezes (Tucci et al., 2010).

O processo fisiológico de digestão dos carboidratos ocorre pela ação de enzimas distribuídas ao longo do trato gastrointestinal. Amilases salivar e pancreática, bem como as glicosidases das microvilosidades do enterócito duodenal atuam sequencialmente sobre os carboidratos, reduzindo-os a monossacarídeos, que são absorvidos (Thomazi et al., 2008).

A digestão dos carboidratos começa na boca pela ação da α -amilase salivar, que hidrolisa as ligações α -1,4 do amido, os produtos desse processo são maltose, maltriose e dextrina de pequeno porte. O processo de digestão do amido continua no intestino delgado pela ação da α -amilase secretada pelo pâncreas (Tucci et al., 2010). O intestino delgado é o principal local de absorção de monossacarídeos. Dois mecanismos são responsáveis pelo processo: transporte ativo e difusão facilitada (Thomazi et al., 2008). O processo de digestão é completado pelas enzimas componentes da membrana liberadas nas microvilosidades duodenais (maltase, sacarase, α -dextrinase e lactase, também conhecidas como dissacarídeses ou glicosidases) que produzem a glicose, outros monossacarídeos absorvíveis, frutose, e galactose. Uma pequena proporção dos monossacarídeos pode ser absorvida de forma passiva, no entanto, uma proteína transportadora é requerida (Tucci et al., 2010). Monossacarídeos absorvidos são distribuídos para a circulação e enviados ao fígado, órgão que regula a glicemia tanto no período pós-prandial quanto em períodos de jejum (Thomazi et al., 2008).

2.3 Mecanismos de hidrólise da ligação glicosídica

A clivagem da ligação glicosídica envolvendo enzimas glicolíticas pode ocorrer por dois mecanismos principais S_N2 , relacionados à substituição nucleofílica direta por molécula de água no carbono anomérico C-1 de glucose, com inversão de estereoquímica (I), menos comum, normalmente observada em glucoamilase, ou pelo mecanismo bimolecular de substituição com formação de intermediário covalente, que resulta em retenção de configuração (II), conforme demonstrado na Figura 3. Somente enzimas que atuam com retenção de configuração apresentam atividade de transglicosilação, como diversas α -glucosidases (Krasikov et al., 2001). No mecanismo I, um grupo carboxílico age como ácido e outro como base, diferentemente do mecanismo II, no qual um grupo de ácido carboxílico age como ácido e base e o outro, como nucleófilo.

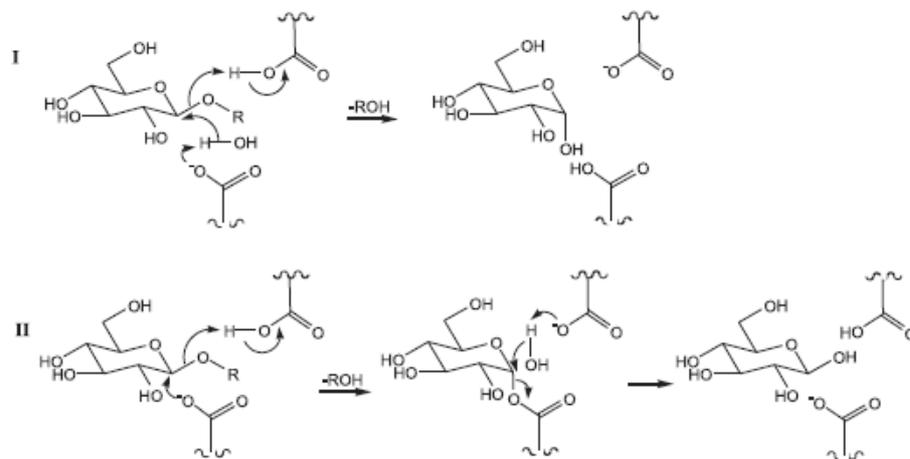


FIGURA 3 Mecanismos I e II propostos para clivagem da ligação glicosídica pela ação de glicosidases (Melo & Carvalho, 2006).

No entanto, algumas evidências têm sugerido a geração de íon no estado de transição, pelo mecanismo S_N1 , com participação de aminoácidos do sítio catalítico contendo grupos carboxílicos, com clivagem da ligação entre o

carbono anomérico e o oxigênio glicosídico, gerando espécies positivamente carregadas, como carbocátion (A) e íon oxocarbênio (B) (Figura 4). O estado de transição necessário para hidrólise da ligação glicosídica é caracterizado pela orientação pseudo-axial da ligação C-O a ser quebrada e conformação distorcida “skew” (Melo & Carvalho, 2006).

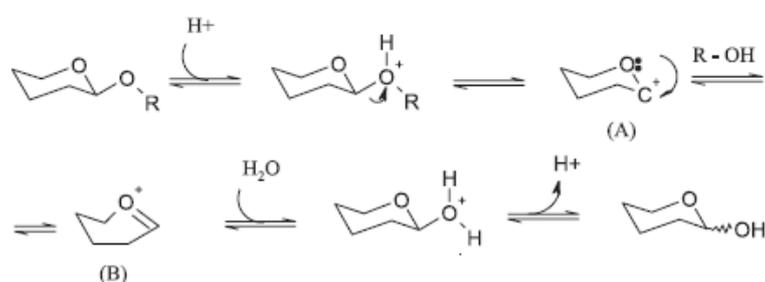


FIGURA 4 Formação de carbocátion (A) e íon oxocarbênio (B) durante a clivagem da ligação glicosídica pela ação de glicosidases (Melo & Carvalho, 2006).

2.4 Alfa amilase

No processo de degradação do amido, as enzimas envolvidas podem ser classificadas de acordo com o modo de ação em endoamilases, exoamilases e enzimas de desramificação. As endoamilases são representadas pelas α -amilases, que hidrolisam o amido nas ligações internas. As exoamilases englobam as glicoamilases fúngicas e as β -amilases bacterianas e de cereais. Estas liberam unidades de glicose e maltose a partir das extremidades do polímero. Já as enzimas de desramificação atuam sobre as ligações glicosídicas α -1,6 que não podem ser clivadas por α - e β -amilases (Silva, 2008).

A α -amilase é encontrada em plantas, animais, e microorganismos e catalisa a hidrólise dos carboidratos complexos em açúcares simples, como maltose, maltotriose e glicose. Oficialmente, é denominada α -1,4-glucano-4-

glucanohidrolase classificada pela sigla EC 3.2.1.1. atuante sobre ligações glicosídicas α -1,4. A hidrólise pela α -amilase ocorre em diversos passos, começando com a ligação do substrato à enzima, seguida da separação do polímero, e um processo hidrolítico para liberação de diversas moléculas menores (Antunes, 2008).

Estudos de difração de raios-X da amilase pancreática suína forneceram uma prospecção do mecanismo enzimático da amilase (Whitcomb et al., 2007). A degradação do amido pelas α -amilases *in vitro* tem dois mecanismos propostos: o ataque múltiplo e o ataque em multicadeia. No primeiro, a enzima pode se ligar a uma determinada região do substrato e liberar apenas uma molécula, enquanto que a outra porção mais longa do polímero é retida para posterior hidrólise. Já no ataque em multicadeia, a ação da enzima ocorre com apenas uma reação hidrolítica, que resulta em duas moléculas de tamanho semelhante (Muralikrishma & Nirmala, 2005).

Cerca de 5-6% do total de proteínas nas secreções pancreáticas são α -amilase, uma glicoproteína de 512 aminoácidos com um peso molecular de 57,6 kDa, com uma única cadeia polipeptídica. Ao contrário de outros zimogênios pancreáticos, a α -amilase não tem uma pro-forma inativa (Whitcomb et al., 2007). Em mamíferos e insetos, a α -amilase é estruturada em três domínios protéicos: o domínio A, que proporciona estrutura para as duas porções flexíveis, o domínio B, com formação mista de folhas β e α -hélices, e uma unidade globular que constitui o domínio C, localizado no lado oposto à inserção do domínio B em A (Figura 5) (Kandra et al., 2005).

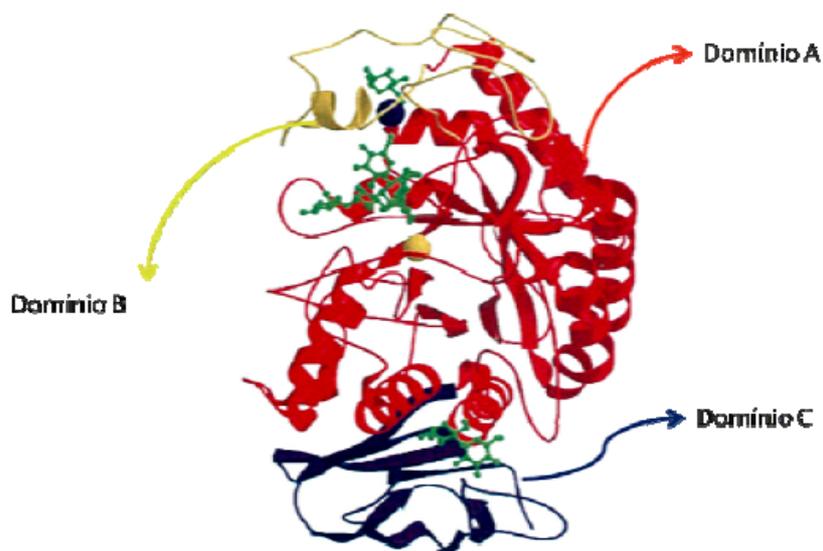


FIGURA 5 Estrutura terciária da α -amilase pancreática. Domínio A em vermelho, domínio B em amarelo e domínio C em azul. O íon cálcio (esfera azul) e o íon cloreto (esfera amarela) estão ligados aos domínios A e B. A figura exemplifica um derivado da acarbose (em verde) ligado ao sítio ativo. Payan, 2004.

A ligação do substrato à enzima ocorre nos subsítios formados na interface dos domínios A e B, sendo que o número e a natureza química dos subsítios variam de acordo com a origem da α -amilase. A integridade estrutural da enzima é cálcio dependente, e necessita de íons cloreto para exercer atividade catalítica. Os sítios de ligação desses íons, que são funcionalmente importantes para a atividade enzimática, envolvem também os domínios A e B (Payan, 2004). O sítio de ligação do substrato contém 5 subsítios, com o sítio catalítico posicionado no subsítio 3. O substrato pode ligar-se pelo resíduo de glicose nos subsítios 1 ou 2, permitindo a clivagem entre o primeiro e o segundo ou segundo e terceiro resíduos de glicose. Por conseguinte, amilase preferencialmente cliva o interior da molécula, especificamente as ligações α -(1,4). Os produtos resultantes da digestão pela α -amilase são uma mistura de maltose, maltotriose e

unidades ramificadas de glicose que contém 6-8 unidades de glicose com ligações tanto α -(1,4) e α -(1,6). Posteriormente, enzimas intestinais da borda em escova: maltase e isomaltase completarão a digestão do amido (Whitcomb et al., 2007).

A inibição da α -amilase humana pode dificultar a digestão dos carboidratos complexos, reduzindo assim a absorção e conseqüente diminuição da disponibilidade de promovendo ou apoiando a perda de peso e a diminuição da glicemia pós-prandial (Chokshi, 2007).

2.5 Inibição da α -amilase

Inibidores de α -amilase foram identificados em muitas espécies de plantas. Em 1943, Kneen e Sandstedt descreveram a inibição da atividade enzimática por substâncias derivadas de trigo, centeio, sorgo. Bowman encontrou atividade semelhante em extratos aquosos de feijão branco. Desde então, os inibidores de α -amilase foram isolados de várias outras espécies vegetais, incluindo muitas variedades de feijão comum, *Phaseolus vulgaris* (branco, vermelho e preto) (Chokshi, 2007).

Diversos tipos de compostos orgânicos são conhecidos por sua atividade inibitória sobre a α -amilase. Geralmente inibidores não protéicos são moléculas de baixo peso molecular (compostos fenólicos e açúcares). Os inibidores protéicos podem ser classificados de acordo com a estrutura. Há um grupo encontrado em fungos do gênero *Streptomyces* e outros 6 grupos oriundos de vegetais superiores (Silva, 2008).

Segundo Richardson (2001), os inibidores de α -amilase protéicos podem ser classificados de acordo com sua estrutura terciária em 6 tipos: proteína-CM, kunitz, taumatina, knotina, tionina e lectina.

As proteínas-CM são também conhecidas como inibidores de origem cereal, com até 160 resíduos de aminoácidos. Geralmente tem atividade não somente sobre α -amilases como também sobre tripsinas, ao contrário de outros inibidores que apresentam especificidade apenas para amilases (Svensson et al., 2004).

Proteínas tipo kunitz são inibidores com massa molecular de 20 kDa e foram estudados por inibir especificamente α -amilases de insetos e também a subtilisina (uma serino protease).

Os inibidores protéicos tipo taumatina, knotina e tionina inibem as α -amilases de insetos, mas não as de mamíferos. O milho contém o inibidor zeamatina, do tipo taumatina. O tipo knotina é representado pelo inibidor isolado do amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.), também conhecido como pau-roxo. Com 32 resíduos de aminoácidos, é o menor inibidor já descrito. Já o tionina é representado pelos inibidores do sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (Svensson et al., 2004).

Os inibidores do tipo lectina (α -AI) são tipicamente representados pelos inibidores encontrados no feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), e são descritas 3 isoformas. A isoforma mais caracterizada, conhecida como α -AI1, foi identificada como um inibidor da α -amilase homólogo a fitohemaglutinina (PHA). A segunda variante da α -AI, chamado α -AI2, é encontrada em alguns tipos de feijões selvagens. Estas duas variantes alélicas têm especificidades diferentes de inibição. AI1 inibe α -amilase pancreática de mamíferos, bem como a α -amilase do *C. maculatus* e *C. chinensis*, mas não inibe a α -amilases do *Z. subfasciatus* (ZSA). Em contraste, o α -AI2 não inibe as três primeiras amilases mencionadas, mas inibe a ZSA (Franco et al., 2002).

Para chegar a sua forma ativa, compreendendo duas subunidades glicopeptídicas não covalentemente ligadas, α e β , de 7,8 e 14 kDa, respectivamente, os α -AIs são pós-traducionalmente modificados. A proteólise

que leva à ativação de α -AI1 foi estudada por espectrometria de massa. Resultados sugerem que ocorra uma clivagem simples na porção carboxi terminal de Asn77, presumivelmente por uma protease de sementes Asn-específica. Asn79 é removido, aparentemente, pela ação de uma carboxipeptidase. Além disso, 19 resíduos C-terminais da cadeia β do α -AI1 são retirados. α -AI2 mostra clivagens semelhantes a α -AI1, mas com um padrão de glicosilação um pouco diferente. Ambos os inibidores (α -AI1 e α -AI2), na forma madura apresentam uma estrutura heterotetramérica de duas cadeias α e duas cadeias β altamente glicosiladas (Pueyo et al., 1993).

A terceira isoforma, α -AIL (também conhecida como α -AI3), isolada de *Phaseolus vulgaris* cv Rico 23 possui uma proteína de cadeia simples. Esta proteína pode representar um intermediário evolutivo entre fitoemaglutininas (PHA), arcelinas e inibidores de α -amilase. Curiosamente, inibe especificamente α -amilases fúngicas e, adicionalmente, possui atividade hemaglutinante, mostrando que essas duas atividades não são excludentes e que a clivagem provavelmente não é um pré-requisito para inibição de α -amilase (Franco et al., 2002).

2.5.1 Inibidor de α -amilase de feijão branco

Extratos brutos de feijão comum contendo inibidores da α -amilase tipo lectina foram usados *in vivo* como bloqueadores da absorção de amido no início de 1980, para o controle da glicemia de indivíduos portadores de diabetes mellitus e obesidade. Essas primeiras tentativas foram sem sucesso, devido à presença indesejável de PHAs e inibidores de proteases no extrato. Mais tarde, resultados mais consistentes foram obtidos a partir da administração de α -AI purificado. Esta classe de inibidores tem sido utilizada por suas propriedades inseticidas para proteger as sementes da predação de insetos, e a farinha de

feijão branco usada como auxiliar no tratamento da obesidade e do diabetes (Franco et al., 2002).

No feijoeiro, o α -AII acumula-se nas sementes, perfazendo de 9 a 11% do total de proteínas. Na semente é concentrado no eixo, com teores três vezes maiores do que nos cotilédones. Aparentemente, isso ocorre porque nesta região ha uma glicosilação mais eficiente. Não foi detectado α -AII em outros órgãos da planta (Obiro et al., 2008).

A síntese do AII no feijão branco ocorre ao mesmo tempo em que formam-se as proteínas faseolina e fitohemaglutinina (PHA), sendo acumulado nos vacúolos de armazenamento de proteínas. O α -AII é uma lectina do feijão comum, que é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso, modificada no complexo de Golgi pela remoção de um peptídeo marcador e após uma N-glicosilação, é transportada para os vacúolos de armazenamento de proteína onde é proteoliticamente processada. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), realizada nas frações microsomais, mostraram que frações de 30 a 35 KDa estão associadas ao retículo endoplasmático, enquanto que uma de 14 a 19 kDa estão associadas ao complexo de Golgi e vacúolos de armazenamento (Moreno et al., 1990). O α -AII é detectável 17 dias após a polinização nos cotilédones e no eixo da semente, a partir daí, há um aumento constante e a concentração máxima ocorre depois de 28 dias de maturidade. Há necessidade de pesquisas para avaliar a relação entre o teor de α -AII e a maturação para definição da melhor época para obtenção de um rendimento máximo com maior economia (Obiro et al., 2008).

O α -AII caracteriza-se por uma natureza tetramérica, o que justifica as observações de que cada molécula do inibidor de AII inibe duas moléculas de α -amilase pancreática, classificando-o como divalente em seu modo de ação inibitória. Desta forma, tem sido relatado em vários estudos uma relação estequiométrica de 2:1 em relação à proporção 1:1 da acarbose e ciclodextrinas,

configurando-se, *in vitro*, um inibidor mais potente do que a acarbose, baseando-se na concentração molar. No entanto, com base no peso molecular, devido ao menor peso da acarbose, a taxa de reação com a enzima é muito mais rápida, pois não há necessidade de alteração conformacional durante o processo de ligação (Obiro et al., 2008).

2.6 Efeitos fisiológicos do inibidor de α -amilase de feijão branco

Evidências experimentais crescentes têm sugerido que extratos ou derivados de feijão branco, *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae), podem ter a capacidade de reduzir a ingestão de alimentos, o depósito lipídico corporal e a glicemia (Maccioni, 2010).

Os efeitos da utilização do α -AI também têm sido demonstrados na redução da glicemia pós prandial e da concentração plasmática de insulina. Além disso, quando administrado em conjunto com as refeições, o α -AI têm-se mostrado eficaz na redução da absorção gastrointestinal de carboidratos, sem causar desconforto (Chokshi, 2007).

Recentemente, tem sido realizada uma série de experimentos com o objetivo de caracterizar os efeitos anorexígenos de um extrato seco padronizado de *P.vulgaris* recém-produzido, denominado Beanblockw[®]. Sua administração aguda e crônica é dose dependente na redução da ingestão de alimentos em ratos e camundongos. Notadamente, esse extrato mostrou-se eficaz na redução da ingestão de alimentos e líquidos altamente palatáveis, incluindo biscoitos amanteigados e bebidas achocolatadas e de alimentos regulares ou amido enriquecido, o que sugere que os derivados de *Phaseolus vulgaris* podem ter capacidade de reduzir seletivamente o apetite para a ingestão destes produtos (Maccioni, 2010).

O mecanismo exato do efeito do extrato seco de *Phaseolus vulgaris* na ingestão de bebidas achocolatadas ainda é desconhecido. Sugerem-se dois mecanismos de ação na tentativa de elucidar, além deste, os efeitos sobre a ingestão alimentar, peso corporal e glicemia. Ambos os mecanismos são baseados na presença de três lectinas: fitohemaglutininas, arcelinas e inibidores de α -amilase (três isoformas isoladas de feijão). Estas lectinas possuem graus elevados de sequência (40-95%) de aminoácidos com similaridade. Especificamente, a inibição da α -amilase pancreática: (a) suprime o metabolismo do amido, resultando em uma diminuição da glicemia, e (b) atrasa o esvaziamento gástrico, produzindo saciedade e por sua vez, diminuindo a ingestão de alimentos, como citado anteriormente. No entanto, o efeito sobre a absorção de carboidratos e no metabolismo, no caso das bebidas achocolatadas empregadas na investigação, com teor insignificante de amido e açúcares complexos, torna improvável que a inibição intraluminal da α -amilase desempenhe um papel relevante. Mecanismos adicionais podem envolver as lectinas, que ligam-se às microvilosidades intestinais, estimulando a liberação de colecistocinina (CCK) e peptídeos glucagon-like que modulam a regulação central da saciedade, do apetite e do consumo de alimento (Maccioni, 2010).

2.7 Antinutrientes e feijão branco

Além dos α -AI, o feijão contém substâncias antinutricionais potencialmente tóxicas relacionadas à efeitos deletérios como a redução da eficiência alimentar, alterações histopatológicas e até morte em animais de laboratório. O feijão comum possui alguns atributos indesejáveis, tais como: fitatos, fatores flatulentos, compostos fenólicos, inibidores enzimáticos, lectinas e alergênicos, os quais devem ser eliminados para sua efetiva utilização (Pereira et al., 2009).

Em seres humanos, o consumo de feijão cru ou mal cozido tem sido associado ao severo, mas passageiro, desconforto gastrointestinal. Esses efeitos têm sido atribuídos em grande parte às fitohemaglutininas (PHA), que estão presentes em níveis elevados no feijão cru. O teor de PHA é dependente da variedade (Fantini et al., 2009). Lectinas são glicoproteínas que podem exibir proporções variáveis de subunidades leucócitos reativas (L-PHA) e eritrócitos polipeptídeo reativas (E-PHA), que são reduzidas durante o cozimento do feijão. O feijão branco cru pode conter 20.000-70.000 unidades PHA.g⁻¹ comparado a 200-400 unidades de PHA no feijão cozido (Chokshi, 2007).

Além das lectinas, destacam-se também os inibidores de proteases, como o inibidor de tripsina. São substâncias de natureza protéica que interferem na atividade de sistemas enzimáticos do trato digestivo. As proteases são enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas como primeiro passo para a absorção das proteínas. Esta inibição se traduz, *in vivo*, numa redução da digestão protéica (Pereira et al., 2009). O inibidor de protease mais abundante no feijão é o de Bowman-Birk (BBI), termoestável, com peso molecular ao redor de 9000 Da, tem 2 sítios ativos, inibindo simultaneamente a tripsina e a quimotripsina. A forte inibição de tripsina tem sido associada à hiperplasia e/ ou hipertrofia pancreática, pelo aumento excessivo da secreção de tripsina pelo mecanismo de auto-regulação por feed back. No entanto, atualmente o interesse por esta classe de inibidores de proteases é principalmente baseado nas descobertas de que o BBI pode atuar como agente preventivo do câncer *in vitro* e *in vivo*. Os BBIs também mostraram atividade antiinflamatória pela inibição de proteases envolvidas no processo inflamatório (Amorim et al., 2009).

2.8 Perspectivas dos estudos do α -AI de feijão branco

Além da perspectiva como auxiliar no tratamento da obesidade e do diabetes pela diminuição da disponibilidade calórica e da glicemia pós prandial, estudos tem demonstrado que a inibição da α -amilase pode atuar reduzindo a incidência de câncer de cólon. O aumento da atividade microbiana no trato gastrointestinal resultante do consumo de α -AI1 pode intensificar o processo de fermentação do amido, com consequente elevação dos níveis de butirato. Sugere-se que o butirato cause uma resposta apoptótica aos danos do DNA causados por carcinogênese genotóxica no colon distal. Tal resposta promove a remoção de clones mutantes que evoluiriam à malignidade. Além disso, a presença do α -AI1 no trato gastrointestinal ocasiona uma ação similar ao amido resistente, que possui efeito pré-biótico e uma maior concentração de amido não digerido para ser fermentado, produzindo butirato (Obiro et al., 2008).

2.9 Considerações finais

O α -AI1 extraído de feijão branco apresenta-se como um promissor auxiliar no tratamento da diabetes. Há vários aspectos que ainda requerem estudos, como a dose ideal e a segurança decorrente do uso deste inibidor, bem como efeitos provenientes da alteração da digestão dos carboidratos a longo prazo. Além disso, faz-se necessário um entendimento aprofundado do mecanismo de inibição da α -amilase que possa embasar a prospecção de inibidores sintéticos. Adicionalmente o α -AI1 apresenta perspectivas inovadoras na prevenção de câncer colo retal.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, A. F. **Atividade inibitória de extratos vegetais do cerrado sobre alfa-amilases**. 2008, 96 p. Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

AMORIM, L. L. **Formas reduzidas de inibidor Bowman-Birk, biodisponibilidade em óleo isolado de camundongo e atividade no proteassoma**. 2009, 78p. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

CELLENO, L.; TOLAINI, M. V.; D'AMORE, A.; PERRICONE, N. V.; PREUSS, H. G. A Dietary supplement containing standardized *Phaseolus vulgaris* extract influences body composition of overweight men and women. **International Journal of Medical Science**, Baltimore, v.4, n.1, p. 45–52, Jan. 2007.

CHOKSHI, D. Subchronic oral toxicity of a standardized white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) extract in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Kearny, v.45, n.3, p.32–40, June 2007.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T.; ENGLYST, H. N. Prebiotic digestion and fermentation. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.73, n.4, p.415S–420S, Feb. 2001.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.3, p.945-954, mai-jun, 2009.

ELIASSON, A.C. **Starch in food – Structure, function and applications**. New York: Boca Raton CRC, 2004. 605p.

ENGLYST, K. N.; ENGLYST, H. N. Carbohydrate bioavailability. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.94, n. 1, p.1–11, Mar. 2005.

FANTINI, N.; CABRAS, C.; LOBINA, C.; GIANCARLO, C.; GESSA, G. L.; RIVA, A.; DONZELLI, F.; MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E.; CARAI, M. A. M. Reducing Effect of a *Phaseolus vulgaris* dry extract on food intake, body weight, and glycemia in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.57, n.19, p.9316–9323, Apr. 2009.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.29, n.2, p. 397–412, Jan. 2002.

KANDRA, L.; REMENYIK, J.; BATATA, G.; SOMSÁK, L.; GYEMANT, G.; PARK, K. H. Enzymatic synthesis of a new inhibitor of amylases: acarviosinyl-isomaltosyl-spirothiohydantoin. **Carbohydrate Research**, Chicago, v. 340, n.7, p. 1311-1317, May 2005.

KRASIKOV, V. V.; KARELOV, D. V.; FIRSOV, L. M. α -Glucosidases. **Biochemistry**, Moscow, v.66, n.3, p.267-281, Mar. 2001.

LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. **Carbohidratos em alimentos regionales Iberoamericanos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006. 648p.

MACCIONI, P.; COLOMBO, G.; RIVA, A.; MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E.; GESSA, G. L.; CARAI, M. A. M. Reducing effect of a *Phaseolus vulgaris* dry extract on operant self-administration of a chocolate-flavoured beverage in rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.104, n.5, p.624–628, Mar. 2010.

MELO, E. B.; CARVALHO, I. α e β -glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p.840-843, Ago. 2006.

MORENO, J.; ALTABELLA, T.; CHRISPPEELS, M.J. Characterization of α -amylase inhibitor, a lectin-like protein in the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiology**, Bethesda, v.92, n.31, p.703–709, July 1990.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α -amylases – an overview. **Carbohydrate Polymers**, Lyon, v. 60, n.4, p. 163-173, June 2005.

NATÉRCIA, F. Plantas que se transformam em fábricas de proteínas. **Inovação Uniemp**, Campinas, v.2, n.5, p. 38-39, Nov. 2010.

NEGRI, G. Diabetes mellitus: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 2, p.121-142, Abr. 2005.

NELSON D. L.; COX, M. M. **Carbohydrates and lycobiology. In: Lehninger principles of biochemistry**. New York: Worth Publishers, 2007. p. 293-324.

OBIRO, W. C.; ZHANG, T.; JIANG, B. The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.100, n.1, p.1-12, July 2008.

OLIVEIRA, A.F.; VALENTE, J.G.; LEITE, I.C. Fração da carga global do diabetes mellitus atribuível ao excesso de peso e à obesidade no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Panamá, v.27, n.5, p.338–44, Mar. 2010.

PAYAN, F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1969, n.2, p. 171-180, Feb. 2004.

PEREIRA, L. L. S.; SANTOS, C. D.; CORRÊA, A. D.; SOUSA, R. V. Estudo comparativo entre inibidor de α -amilase (Faseolamina) Comercial e Farinha de Feijões Branco, Preto e Carioca. **Infarma**, Brasília, v.21, n 11/12, p. 11-14, Nov. 2009.

PUEYO, J. J., HUNT, D. C.; CHRISPPEELS, M. J. Activation of bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor requires proteolytic processing of the pro-protein. **Plant Physiology**, Bethesda, v.101, n.4, p.1341-1348, Apr. 1993.

RICHARDSON, M. Seed storage protein: the enzyme inhibitors. **Methods in Plant Biochemistry**, New York, v.5, n.2, p.295-305, Sep. 2001.

SILVA, E. M.. **Ação inibitória de extratos de plantas do cerrado sobre α -amilases com ênfase em *Kielmeyera coriacea***. 2008. 141 p. Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SVENSSON, B.; KENJI, F. NIELSEN, P. K.; BONSAGER, B. C. Proteinaceous α -amylase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1696, n.2, p. 145-156, Feb. 2004.

THOMAZI, F.; RIBAS, A.; SERPA, E.; SLOBODIAN, L.; BIZI, P.; MAHFOUD, R.; PINTO, S. C. A.; TORRES, M. F.; HANCKE, F. S.; GUIMARÃES, A. T. B.; RANCHER, J. A. Avaliação dos componentes séricos e do ganho de peso de ratos submetidos à dieta com sacarose e à dieta com aspartame. **RUBS**, Curitiba, v.1, n.3, p.37-43, set./dez. 2008.

TUCCI, S. A.; BOYLAND, E. J.; HALFORD, J. C. G. The role of lipid and carbohydrate digestive enzyme inhibitors in the management of obesity: a review of current and emerging therapeutic agents. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, Manchester, v.:3, p. 125-143, May 2010.

WHITCOMB, D. C.; LOWE, M. E. Human Pancreatic Digestive Enzymes. **Digestive Diseases and Sciences**, v.52, n.2, p.1-17, Jan. 2007.

PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO INIBIDOR PROTÉICO DE α -AMILASE DE FEIJÃO BRANCO

Luciana Lopes Silva Pereira, Chrystian Araujo Pereira, Custódio Donizete dos Santos, Livia Cabral Sátiro, Tamara Rezende Marques, Maria Cristina Silva.

Publicado em: *Ciência e Natura, UFSM, 32 (2): 51-59, 2010.*

1 RESUMO

Os inibidores de alfa-amilase tem sido indicados como auxiliares para produzir perda de peso e controlar o diabetes mellitus tipo 2 pela redução da absorção do amido. Foi padronizado neste trabalho o processo de extração de inibidor alfa-amilase do feijão branco determinando os parâmetros referentes a escolha e proporção de extrator, tempo de agitação e o tratamento térmico. Os resultados indicam a metodologia utilizando a água como extrator, na proporção de 1:5 seguido de 3 re-extrações consecutivas, sob agitação por 15 minutos e tratamento de 70 ° C por 5 minutos como a opção mais rápida e eficiente na extração de inibidor.

Palavras-chave: inibidor de α -amilase, extração, feijão branco.

2 SUMMARY

Alpha-Amylase inhibitors have been indicated as auxiliary for loss of weight and in the management of diabetes mellitus type 2 for the reduction of the absorption of the starch. This work standardized the process of extraction of white beans alpha-amylase inhibitor determining the extractor, time of agitation and the conditions for thermal treatment. The results indicate the water as extracting, in the ratio of 1:5, followed for 3 consecutives extractions under agitation for 15 minutes and 70°C thermal treatment for 5 minutes as faster and efficient option in the extraction of inhibitor.

Keywords: α -amylase inhibitor, extraction, white bean.

3 INTRODUÇÃO

A necessidade de novos fármacos tem estimulado a pesquisa de moléculas que atuem como inibidores enzimáticos e a triagem de substratos e/ou inibidores que se liguem seletivamente às enzimas¹. Os inibidores protéicos de α -amilase (1-4 α D-glucan-glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) são amplamente distribuídos em plantas, principalmente em cereais (trigo e cevada) e feijão. Esta inibição induz tolerância aos carboidratos, saciedade, perda de peso e prolonga o esvaziamento gástrico; efeitos que podem ser úteis no tratamento da obesidade e diabetes mellitus não insulino-dependente².

Os inibidores de α -amilase foram extraídos e purificados a partir de várias fontes. Os métodos relatados envolvem tratamento por calor, 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 uma extração eficiente. Sabendo-se que processos de purificação começam com uma extração inicial, esta é uma etapa crucial para o sucesso no rendimento final.

O método usado para extrair as proteínas tem efeitos importantes nas suas propriedades. O tratamento alcalino apresenta inúmeros inconvenientes, tais como, desnaturação protéica, formação de compostos tóxicos (lisinoalanina), escurecimento da amostra e extração de compostos não-protéicos³. Muitos métodos têm sido propostos ao longo dos anos para a extração do inibidor protéico de α -amilase, mas não existe uma metodologia considerada universal avaliando-se todos os parâmetros da extração.

Neste contexto, o objetivo neste trabalho foi padronizar e otimizar o processo de extração do inibidor de α -amilase de farinha de feijão branco (FFB), testando parâmetros como escolha do extrator, tempo de agitação, proporção de extrator e tempo do tratamento térmico a 70°C.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e equipamentos

O feijão branco (*Phaseolus vulgaris*) foi cultivado em Campo Belo, MG, e adquirido em supermercado local. Para obtenção da farinha, os grãos foram triturados em moinho manual e a seguir em um moinho de facas (TE 631 Tecnal) a fim de obter uma granulometria menor.

Os reagentes empregados no preparo dos extratos foram em grau PA. Os extratos foram obtidos após agitação em agitador horizontal e centrifugados em centrífuga com rotor horizontal Sigma 2-5.

A enzima α -amilase pancreática suína foi do tipo VI, da SIGMA, tendo como substrato uma solução de amido 1%. Os ensaios de inibição enzimática foram realizados em banho-maria a 37°C.

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

4.2 Preparo dos extratos de FFB

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 acondicionados, em frasco hermeticamente fechado, ao abrigo da luz, até a utilização nas extrações.

Os extratores utilizados foram: água destilada, solução salina (0,2M), tampão Tris/HCl 0,05M, pH 7,0 e tampão Tris/HCl 0,05M e salina 0,2M. A farinha de feijão branco e o extrator foram agitados por 1 hora, filtrados em tecido organza e centrifugados por 10 minutos a 2500g. O sobrenadante contendo a proteína inibidora foi utilizado nas análises.

4.3 Condições de extração

O melhor solvente determinado pelo ensaio de comparação entre os extratores foi utilizado para a extração do inibidor de α -amilase de FFB em 5 períodos de tempo: 15, 30, 60, 120 e 180 minutos.

O extrato de FFB foi preparado nas proporções 1:5, 1:10, 1:20 e 1:40. A FFB e o extrator foram agitados por 1 hora, filtrados em tecido organza e centrifugados por 10 minutos a 2500g. Foram feitas re-extrações da seguinte forma: o precipitado foi ressuscitado no mesmo volume inicial, agitado e centrifugado conforme a etapa anterior. O precipitado obtido passou pelo mesmo processo que foi repetido por cinco vezes, o que foi denominado extração consecutiva. Os extratos provenientes das re-extrações e o extrato bruto acrescido dos re-extratos foram reunidos e as análises de inibição enzimática foram realizadas levando-se em consideração as diluições ocorridas no processo.

O extrato de FFB foi aquecido em banho-maria a 70°C por diferentes períodos de tempo (5, 15, 30, 45 e 60 minutos). Após o tempo determinado o extrato foi centrifugado e as proteínas desnaturadas foram removidas por centrifugação a 2500g por 10 minutos. A inibição enzimática foi testada no sobrenadante.

4.4 Ensaio de inibição da α -amilase

A atividade de amilase inibida foi determinada segundo Noelting & Bernfeld⁴, 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 minutos a 37°C. O ensaio foi cinético, sendo que, em cada análise, a mistura de reação foi incubada por quatro períodos de tempo. Os 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 α -amilase foi expressa em unidades (U) que correspondem à formação de um μmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio. Um UIA/g (unidade de inibição de α -amilase) corresponde à inibição total de 1 U de α -amilase por grama de FFB.

4.5 Determinação da atividade inibitória específica

A atividade inibitória específica foi expressa como unidade de inibição de α -amilase por grama de proteína (UIA/g de proteína).

A quantificação das proteínas foi realizada pela metodologia proposta por Bradford.⁵

4.6 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.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes para avaliar as melhores condições para extração do inibidor de α -amilase de FFB foram realizados com base nas metodologias descritas na literatura.

5.1 Condições de extração

5.1.1 Comparação entre os extratores:

A tabela 1 mostra os valores obtidos para a inibição da α -amilase em UIA/g farinha utilizando quatro extratores.

Tabela 1 Inibição da α -amilase em unidades de inibição (UIA/g) por diferentes extratos de FFB

Extrator	UIA/g * farinha
Água	54,07 ^a
Salina	50,11 ^a
Tampão Tris	36,88 ^b
Tampão Tris/Salina	28,50 ^c

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

Pode-se verificar que os melhores extratores foram água e solução salina, que não apresentaram diferença significativa quanto à extração do inibidor. Vários solventes são comumente utilizados na extração do inibidor protéico de α -amilase, destacando-se a água^(6,7,8), o tampão Tris⁹, o tampão Tris acrescido de salina^(10, 11, 12) e a solução salina^(2, 13, 14, 15, 16). Entretanto,

considerando os fatores custo e facilidade de preparo e/ou obtenção e os resultados obtidos, a água apresenta-se como a opção mais vantajosa.

5.1.2 Influência do tempo de agitação

Foram testados 5 tempos de agitação (Tabela 2).

Tabela 2 Inibição da α -amilase em unidades de inibição (UIA/g) por extratos aquosos de FFB obtidos em diferentes tempos

Tempo de agitação	UIA/g *
15 minutos	47,54 ^a
30 minutos	47,15 ^a
60 minutos	46,35 ^a
120 minutos	44,77 ^a
180 minutos	43,18 ^a

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

O extrato preparado em água e agitado por 15, 30, 60, 120 e 180 minutos não apresentou diferença na quantidade de inibidor extraído, conforme verificado analisando-se a inibição mostrada na Tabela 2. Há uma variedade de informações quanto ao tempo de agitação na extração do inibidor citadas na literatura que varia desde 1 hora^(10, 16), 2 horas^(7, 17), 3 horas⁹, 4 horas⁶, 5 horas de agitação² até à agitação over night^(13, 14).

Como o aumento no tempo de agitação não acarretou uma melhor extração do inibidor, o tempo utilizado nas análises posteriores foi de 15 minutos de agitação.

5.1.3 Influência da proporção de extrator

A FFB foi submetida à extração em água nas diversas proporções encontradas na literatura de 1:3^(2, 16), 1:5, 1:10^(15, 10, 17), 1:20^(7, 13, 14), e 1:40.

Tabela 3 Inibição da α -amilase em unidades de inibição (UIA/g) por extratos aquosos de FFB em diversas proporções e 3 re-extrações.

Proporção de FFB:água	UIA/g * (sem re-extrações)	UIA/g *(após 3 re-extrações)
1:5	51,01 ^a	61,81 ^b
1:10	50,79 ^a	54,90 ^c
1:20	42,14 ^a	49,93 ^c
1:40	47,02 ^a	52,90 ^c

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

A proporção FFB:água igual a 1:3 apresentou-se muito densa, impedindo uma eficiente agitação e foi desprezada. A proporção FFB:água, não alterou a extração do inibidor.

Em adição, foram realizados testes de re-extrações não encontrados na literatura para avaliar se a inibição aumentaria com extrações consecutivas. Foram feitas re-extrações sucessivas e constatou-se que após a terceira re-extração não havia atividade inibitória da α -amilase.

Os resultados obtidos sugerem que o esquema extração do inibidor de α -amilase de feijão branco em água na proporção de 1:5, sob agitação por 15 minutos seguido de 3 re-extrações, apresenta uma maior inibição.

5.1.4 Influência do tempo de exposição a temperatura de 70°C

O tratamento do extrato à 70°C é feito como uma etapa de pré purificação do inibidor de α -amilase.

O extrato protéico preparado nas condições estabelecidas anteriormente, foi colocado à 70°C para desnaturação das proteínas termolábeis contaminantes². A inibição testada após o tratamento térmico pode ser verificada na Tabela 4.

Tabela 4 Inibição da α -amilase (UIA/g) pelo extrato de FFB e extrato de FFB deixado a 70°C por 5 períodos de tempo

Tempo de exposição a 70°C	UIA/g *	UIA/g de proteína
5 minutos	66,89 ^a	504,52 ^a
15 minutos	57,44 ^b	328,42 ^c
30 minutos	48,41 ^b	220,39 ^d
45 minutos	35,08 ^c	135,71 ^e
60 minutos	27,87 ^c	137,19 ^e
Sem tratamento térmico	64,44 ^a	473,78 ^b

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

Verifica-se que o extrato de FFB exposto à temperatura de 70°C por 5 minutos não apresentou perda da inibição da α -amilase, quando comparado ao extrato que não foi exposto à mesma temperatura. Houve formação de precipitado, indicando a desnaturação de proteínas interferentes instáveis nestas condições, o que é confirmado pelo resultado da atividade inibitória específica que revelou ser maior com 5 minutos de exposição a 70°C. É importante padronizar o tempo ideal para exposição do extrato de FFB a esta temperatura porque o inibidor da α -amilase é protéico e pode ser desnaturado perdendo sua função.

A exposição do extrato a partir de 15 minutos ocasiona uma diminuição gradativa da inibição da α -amilase, sugerindo que o inibidor começa a sofrer desnaturação e perder a função em decorrência de alteração da conformação original. Em processos iniciais utilizados na purificação do inibidor de α -amilase foi utilizado um tratamento a 70°C por 15 minutos¹⁷. No entanto, observamos que após este tempo há um decréscimo de 10,86% da inibição da enzima quando comparado à inibição pelo extrato sem tratamento térmico. Após a exposição do inibidor protéico por 30 e 60 minutos a 70°C, foi observada uma perda da atividade inibitória de 25% e 57%, respectivamente, semelhante à encontrada por Yamaguchi⁹, que relata uma perda de 30% para 30 minutos e de 50% para 60 minutos na mesma temperatura.

6 CONCLUSÃO

A metodologia escolhida para a extração do inibidor protéico de α -amilase de feijão branco pode afetar a quantidade extraída e a sua qualidade. Neste estudo, os solventes, as proporções, re-extrações e a temperatura influenciaram significativamente na eficiência da extração. Os resultados obtidos indicam a metodologia utilizando água como extrator, na proporção de 1:5 seguida de 3 re-extrações sob agitação por 15 minutos e tratamento a 70°C por 5 minutos, como opção mais rápida e eficaz na extração do inibidor.

7 BIBLIOGRAFIA CITADA

1. Cardoso, C. L.; Quím. Nova. **2009**, 32, 1.
2. Chen, X.; Xu, G.; Li, X.; Li, Z.; Ying, H. Process Biochemistry. **2008**, 43, 765.
3. Carrera, R. L.; Ramos, C. S.; Silva, M. R.; Júnior, C. O. L.; Silvestre, M. P. C.; Pirozi, M. R.; Quím. Nova. **2009**, 32, 4.
4. Noelting, G.; Bernfeld, P., Helvetica Chimica Acta. **1948**, 31, 1.
5. Bradford, M. M. Analytical Biochem. **1976**, 72, 1.
6. Udani, J. K.; Singh, B. b.; Barret, M. L.; Preuss, H. G. Nutrition Journal. **2009**, 8, 52.
7. Iguti, A. M.; Lajolo, F. M, J. Agric. Food Chem. **1991**, 39, 12.
8. Lajolo, F. M.; Filho, F. F. J. Agric. Food Chem. **1985**, 33, 132.
9. Yamaguchi, H. Biosci. Biotech. Biochem. **1993**, 57, 2.
10. Kokiladevi, E.; Manickam, A.; Thayumanavan, B. Bot. Bull. Acad. Sin. **2005**, 46, 189.
11. Silva, M. C. M.; Mello, L. V.; Coutinho, M. V.; Rigden, D. J.; Neshich, G.; Chrispeels, M. J.; Grossi-de-Sá, M. F. Pesq. Agropec. Bras. **2004**, 39, 3.

12. Pueyo, J. J.; Hunt, D. C.; Chrispeels, M. J. *Plant Physiol.* **1993**, 101, 1341.
13. Mosca, M.; Boniglia, C.; Carratú, B.; Giammarioli, S.; Nera, V.; Sanzini, E. *Analytica Chimica Acta.* **2008**, 617, 192.
14. Boniglia, C.; Carratú, B.; Stefano, S. D.; Giammarioli, S.; Mosca, M.; Sanzini, E. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 227, 689.
15. Yamada, T.; Hattori, K.; Ishimoto, M. *Phytochemistry.* **2001**, 58, 59.
16. Marshall, J. J.; Lauda, C. *The Journal of Biological Chemistry.* **1975**, 250,20.
17. Tormo, M. A. *British Journal of Nutrition.* **2004**, 92, 785.

**PRECIPITAÇÃO DO INIBIDOR DE α -AMILASE DE FEIJÃO BRANCO:
AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS**

Luciana Lopes Silva Pereira, Custódio Donizete dos Santos, Chrystian Araujo Pereira, Tamara Rezende Marques, Livia Cabral Sátiro.

Publicado em: **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.21, n.1, p. 15-20, jan./mar. 2010.

1 RESUMO

Dietas suplementadas por “starch blockers”, como são popularmente denominados os inibidores de α -amilase, têm sido adotadas de forma crescente. O inibidor extraído do feijão branco diminui o conteúdo calórico fornecido pela ingestão de carboidratos por inibir a enzima α -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 α -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; α -amilase; precipitação; inibição.

2 INTRODUÇÃO

A α -amilase (1-4 α D-glucanglucanohidrolase, EC 3.2.1.1) está envolvida na digestão de carboidratos. Os inibidores protéicos da α -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.¹³ De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS)⁸, 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 2015.¹⁰

Dietas suplementadas por “starch blockers”, como são popularmente denominados os inibidores de α -amilase, têm 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 α -amilase, responsável pela conversão dos carboidratos complexos (amido) em açúcares simples e conseqüentemente diminuindo a absorção de açúcar no intestino delgado.³

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 ^{6, 9, 12}. 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.⁴

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 podem 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.⁵

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

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 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 α -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.

3.2 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 acondicionados 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 10000 g por 10 min. Foi retirada uma alíquota do

sobrenadante final de St para determinação do teor protéico e para as precipitações.

3.3 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% (v/v), 20% (v/v), 30% (v/v), 40% (v/v), 50% (v/v), 60% (v/v), 70% (v/v), 80% (v/v), e 90% (v/v). 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 α -amilase.

3.4 Diálise

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.

3.5 Precipitação isoeétrica por variação de pH

O extrato protéico, preparado conforme descrito anteriormente, apresentou um pH igual a 6,3. Para precipitação isoeétrica de proteínas interferentes os valores de pH foram ajustados como proposto por Pusztai et al.⁹ O pH foi ajustado para 5,0 com HCl 1mol.L⁻¹ 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⁻¹ 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⁻¹ para 6,9 para posteriores análises de inibição enzimática e teor de proteína.

3.6 Atividade Inibitória sobre a α -amilase

O efeito inibidor sobre a atividade de amilase foi determinado segundo Noelting & Bernfeld,⁷ 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 α -amilase foi expressa em unidades (U) que correspondem à formação de um μ mol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio. 1 UIA(unidade de inibição de α -amilase) corresponde à inibição total de 1U de α -amilase.

3.7 Determinação da Concentração de Proteínas Totais

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

3.8 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).

3.9 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.

4 RESULTADOS

4.1 Precipitação com Solventes Orgânicos

A precipitação do inibidor de α -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).

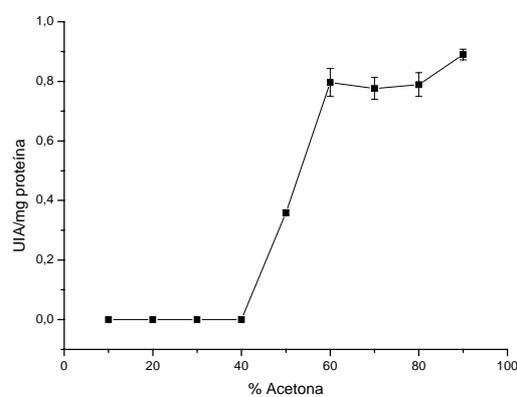


FIGURA 1 Inibição específica (UIA/mg proteína) da α -amilase pelo inibidor extraído de FFB em concentrações crescentes de acetona.

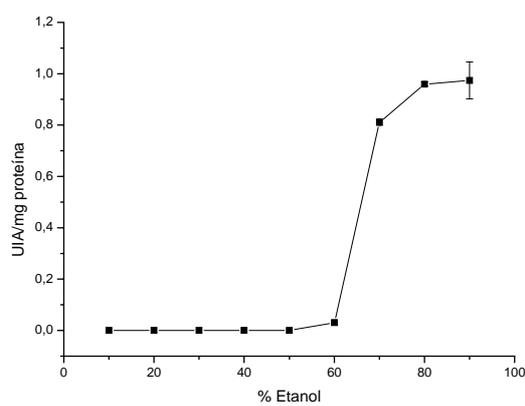


FIGURA 2 Inibição específica (UIA/mg proteína) da α -amilase pelo inibidor extraído de FFB em concentrações crescentes de etanol.

4.2 Precipitação com Adição de Sais

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

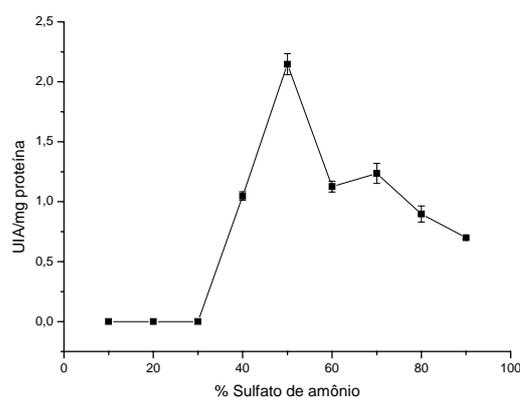


FIGURA 3: Inibição específica (UIA/mg proteína) da α -amilase pelo inibidor extraído de FFB em concentrações crescentes de sulfato de amônio.

4.3 Precipitação por isoeletrica por variação de pH

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

4.4 Comparação entre os Precipitantes

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

Tabela 1 Perfil da inibição específica da α -amilase comparando-se os agentes precipitantes.

Amostra	Inibição da α -amilase*	Proteínas totais (mg/g)	Inibição específica**	Fator de purificação
Extrato bruto	66,89 \pm 7,15	132,62 \pm 5,3	0,501 \pm 0,05 ^c	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ 50%	34,84 \pm 2,35	17,68 \pm 1,3	2,147 \pm 0,360 ^a	4,28
Isoelétrica	36,83 \pm 2,34	18,36 \pm 0,8	2,079 \pm 0,192 ^a	4,15
Etanol 80%	59,95 \pm 5,44	64,16 \pm 3,7	0,959 \pm 0,036 ^b	1,91
Acetona 90%	59,4 \pm 2,4	66,72 \pm 4,7	0,789 \pm 0,04 ^b	1,57

*Inibição expressa em Unidade de inibição de α -amilase/g de FFB (UIA/g FFB)

**Inibição expressa em Unidade de inibição de α -amilase/mg de proteína (UIA/mg proteína). Os valores com as mesmas letras sobrescritas não diferem entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Scott Knott.

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 ($p > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

5.1 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 disto, 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.⁵ Outros afirmam que, diferente dos processos de precipitação por “salting-out” e da precipitação isoelétrica, a precipitação por adição de solventes orgânicos parece ser mais direcionada pelas interações eletrostáticas entre as moléculas de proteína que pelo chamado efeito hidrofóbico.¹⁴

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.⁵

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.¹⁵ na purificação parcial e caracterização da glicoproteína inibidora da α -amilase de feijão branco.

5.2 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 α -amilase de feijão branco como uma etapa prévia à purificação em coluna cromatográfica e em sistema aquoso bifásico.²

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 maior grau 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.⁴

5.3 Precipitação por pH

A precipitação por pH mostrou-se eficiente com a vantagem de não gerar resíduos e ter menor custo que as demais. Tal processo é bastante utilizado como etapa prévia de purificação do inibidor em coluna cromatográfica com resina de troca iônica¹¹ e de interação hidrofóbica.⁹

5.4 Comparações 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 α -amilase de FFB obtido por precipitação variando-se o pH apresenta alta inibição específica quando comparado com o extrato protéico bruto.

6 CONCLUSÃO

A utilização da precipitação do inibidor de α -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 à 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 α -amylase inhibitor from white beans: evaluation of methods. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.21 , n.1 , p.15-20 , jan./mar., 2010.

7 ABSTRACT

Diets supplemented by "starch blockers" as they are popularly known as inhibitors of α -amylase, has been increasingly adopted. It is believed that the inhibitor extracted from the beans decrease the calorie content provided by intake the carbohydrates by inhibiting the enzyme α -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 α -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; α -amylase; precipitation; inhibition.

8 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. 151p.
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 α 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' α -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 α -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 glic mica 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 α -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, 2007.
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 precipita o de tripsina com uso de sais voláteis**. 2004. 113f. Disserta o (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 α -amylase inhibitor from white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*. L). **J. Food Biochem.**, v. 32, n. 1, p. 72-84, fev. 2008.

PURIFICAÇÃO PARCIAL DO INIBIDOR DE α -AMILASE EXTRAÍDO DA FARINHA DE FEIJÃO BRANCO.

Luciana Lopes Silva Pereira, Custódio Donizete dos Santos, Lívia Cabral Sátiro, Stefânia Priscilla de Souza, Marcelo Murad Magalhães, Luiz Carlos de Oliveira Lima.

1 RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi explorar meios alternativos e menos onerosos a serem utilizados como processos de purificação do inibidor de α -amilase (α -AI). Para tanto, foram testados individualmente: extração com variação de pH (de 3 a 10) e temperatura (70 a 95°C), precipitação diferencial (acetona, etanol e sulfato de amônio), cromatografia de filtração molecular e irradiação (2,5 e 5 kGy) da farinha de feijão branco. Nenhuma das vias de purificação propostas extinguiu o efeito inibidor sobre a tripsina. No entanto, apesar do inibidor de tripsina ter sido considerado um fator antinutricional importante por muitos anos, atualmente, tem-se atribuído a ele ação anticâncer e antiinflamatória. Tais descobertas requerem uma avaliação da dose ingerida de inibidor de tripsina do feijão branco e possíveis efeitos benéficos e/ou maléficos *in vivo*.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, inibidor de α -amilase.

2 ABSTRACT

The objective this research was to explore alternative process and cheaply for purification of α -amylase inhibitor (α -AI). For both, were individually tested extraction with different pH (3-10) and temperature (70 to 95° C), differential precipitation (acetone, ethanol and ammonium sulfate), gel filtration chromatography and radiation (2.5 and 5 kGy) of white bean flour. None of the alternatives being purified eliminated the inhibition of trypsin. However, despite the trypsin inhibitors have been considered an important anti-nutritional factor for many years, currently, has been attributed to him anticancer and anti-inflammatory effects. These findings require an evaluation of the ingested dose of trypsin inhibitor from white bean and possible beneficial effects and /or dangerous *in vivo*.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, α -amylase inhibitor.

3 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) é uma rica fonte de nutrientes, sendo considerado no Brasil como o alimento básico para a população, tanto nas áreas rurais quanto urbanas (Costa et al., 2006). Provê quantidades significativas de proteínas, carboidratos, ácidos graxos insaturados (ácido linoléico), fibra alimentar, especialmente fibra solúvel, e é uma excelente fonte de minerais e vitaminas (Cárdenas, 2008). Apesar de tais vantagens, essa leguminosa possui também quantidades apreciáveis de fatores antinutricionais que, por sua vez, apresentam tanto efeitos benéficos, tais como o controle de doenças crônicas e prevenção de câncer, quanto efeitos adversos diminuindo a digestibilidade ou biodisponibilidade dos nutrientes (Cárdenas, 2006). Como fatores antinutricionais presentes no feijão pode-se citar fitatos, fatores flatulentos, compostos fenólicos, inibidores enzimáticos (de proteases e amilase), lectinas e alergênicos (Pereira et al., 2009). Dentre estes, ressaltam-se os inibidores enzimáticos de tripsina e amilase.

Os inibidores de proteases, como o inibidor de tripsina, são substâncias que interferem na atividade de sistemas enzimáticos do trato digestivo. Esta inibição se traduz, *in vivo*, numa redução da digestão protéica (Pereira et al., 2009). Os inibidores de proteases protéicos do feijão apresentam baixa qualidade nutricional devido à composição aminoacídica peculiar com teores reduzidos de metionina, glicina, valina, fenilalanina e triptofano. Apesar de representarem apenas 2,5% da proteína total do feijão, contribuem com cerca de 40% do conteúdo total de cisteína e no entanto, este aminoácido não é biodisponível, em razão da alta resistência ao ataque enzimático apresentada pelos inibidores (Chiaradia e Gomes, 1997).

Os efeitos nocivos dos inibidores de tripsina em animais alimentados com leguminosa crua são complexos, incluindo principalmente alterações

metabólicas do pâncreas (aumento da secreção enzimática, hipertrofia e hiperplasia) e redução da taxa de crescimento (Pereira et al., 2009). Por outro lado, estudos têm reportado que os inibidores de protease são efetivos em reverter o processo carcinogênico induzido quimicamente e pela radiação com raios X *in vitro* e *in vivo* (Amorim, 2009). Contudo, permanece ainda a questão se a ingestão crônica de baixas concentrações de inibidores constituiria risco à saúde humana, principalmente para determinados grupos da população, como crianças e vegetarianos (Cárdenas, 2006).

Já os inibidores de amilase do feijão branco, inibem α -amilase de larvas de insetos, mas não são ativos contra as amilases α ou β do próprio feijão. Por isto tem sido proposto que o seu papel fisiológico seria o de proteger a semente contra ataques de insetos. Tais inibidores são capazes de inibir a α -amilase salivar e pancreática suína, mas não as α -amilases microbianas nem as fúngicas (Yamada et al., 2001). Se os inibidores de α -amilase são nutricionalmente importantes é uma controvérsia, entretanto, estes certamente diminuem a taxa de hidrólise do amido, induzindo perda de peso e prolongam o esvaziamento gástrico; efeitos que podem ser úteis no tratamento da obesidade e do diabetes mellitus (Chen, 2008).

Há um grande interesse na purificação do inibidor de α -amilase. Métodos relatados envolvem tratamento com calor, diálise e cromatografia em DEAE-celulose, Sephadex G-100 e CM-celulose. Tais técnicas apresentam desvantagens para preparações em grande escala, pelo custo elevado e capacidade limitada de purificação (Chen et al., 2008). Assim, para explorar meios alternativos e menos onerosos como processos de purificação do inibidor de α -amilase (α -AI), foram testados individualmente: extração com variação de pH e temperatura, precipitação diferencial, cromatografia de filtração molecular e irradiação da farinha de feijão branco. O objetivo foi extrair o inibidor de α -amilase e retirar o inibidor de tripsina da farinha de feijão branco.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da farinha de feijão branco (FFB)

O feijão branco foi cultivado em Campo Belo, MG, e adquirido em supermercado no município de Lavras, MG. Os grãos com casca foram lavados com água destilada, e secos em estufa com circulação de ar a 30°C até peso constante. Para obtenção da farinha (FFB), os grãos foram triturados em moinho manual e em seguida em um moinho de facas (TE 631 Tecnal) para obtenção de granulometria menor ou igual a 60 mesh.

4.2 Atividade das enzimas

Foram utilizadas nos ensaios as enzimas α -amilase pancreática suína do tipo VI (SIGMA) e tripsina pancreática suína tipo II (MERCK).

4.3 Atividade de α -amilase

A atividade de α -amilase foi determinada segundo a metodologia proposta por Noelting & Bernfeld, 1948 em que 50 μ L da amostra e 50 μ L de enzima α -amilase preparada em tampão Tris 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 acrescido de NaCl 38 mmol L⁻¹ e CaCl₂ 0,1 mmol L⁻¹, foram pré-incubados, por 20 minutos, em banho-maria a 37°C. Após adição de 100 μ L do substrato (amido 1%), a mistura foi incubada por quatro períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 min.) e a reação interrompida adicionando-se 200 μ L do reagente ácido 3,5 dinitrosalicílico e a absorbância do produto da mesma lida em espectrofotômetro a 540 nm, após a reação de óxi-redução.

4.4 Atividade de tripsina

A atividade de tripsina foi determinada segundo a metodologia proposta por Erlanger (1961); 200 μL da amostra e 200 μL de enzima foram incubados em banho-maria, a 37°C , por quatro períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 min.), após adição de 800 μL do substrato *p*-benzoil-D-L arginina *p*-nitroanilida (BAPNA) preparado em tampão TRIS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,2. A reação foi interrompida adicionando-se 200 μL de ácido acético 30% e a absorbância do produto lida em espectrofotômetro a 410 nm.

4.5 Determinação da inibição

A inibição das enzimas foi calculada a partir da determinação das inclinações das retas (gráfico absorbância x tempo) dos ensaios de atividade das enzimas controle (sem amostra) e enzimas + inibidor (com amostra). A inclinação da reta é decorrente da velocidade de formação de produto por minuto de reação e a presença do inibidor ocasiona uma diminuição nessa inclinação. Para calcular a atividade da α -amilase, a partir dessa inclinação, os valores de absorbância foram convertidos em μmol de produto por meio de uma curva padrão de glicose enquanto, para a tripsina, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do BAPNA determinado por Erlanger (1961). As inibições das enzimas também foram calculadas em porcentagem, pela inclinação das retas segundo a equação:

$$I\% = \frac{(\text{controle}) - (\text{inibido})}{(\text{controle})} \times 100$$

4.6 Meios alternativos de purificação

Objetivando encontrar processos alternativos e menos onerosos de purificação do inibidor de α -amilase (α -AI), foram testados: extração com variação de pH e temperatura, precipitação diferencial, cromatografia de filtração molecular e irradiação da farinha de feijão branco. A Figura 1 apresenta o fluxograma das alternativas testadas.

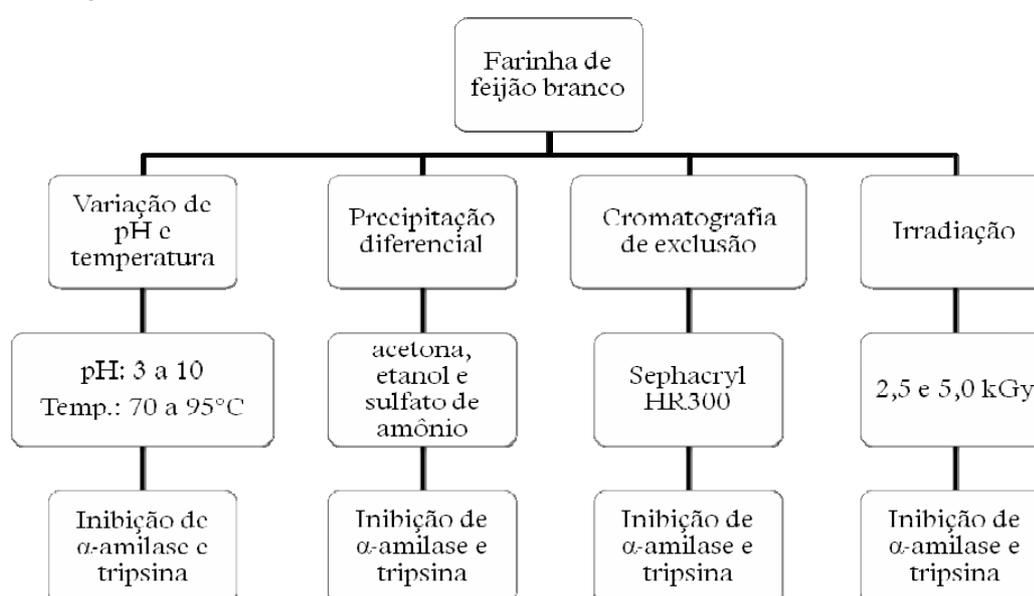


FIGURA 1 Vias de purificação do inibidor de α -amilase de farinha de feijão branco.

4.6.1- 1ª via de purificação: Tratamento térmico e com variação de pH

Foram preparados extratos de FFB em tampões na proporção 1:5 (p/v), com valores de pH definidos. Do pH 3,0 ao 6,0, foi utilizado o tampão citrato-fosfato, tampão Tris para os pHs 7 e 8 e tampão Gly NaOH para os pHs 9.0 e 10.0. Cada extrato foi agitado em agitador horizontal à temperatura ambiente durante 1 hora. Os extratos de FFB em diferentes tampões foram aquecidos em

banho-maria a 70, 75, 80, 85 e 90°C por 15 minutos. Após o tempo determinado, os extratos foram resfriados e centrifugados a 2500g por 10 minutos. As proteínas desnaturadas foram sedimentadas e removidas após a centrifugação. A inibição enzimática foi testada no sobrenadante.

4.6. 2- 2ª via de purificação: Precipitação diferencial

Ao extrato aquoso de FFB 1:5 (m/V), foram adicionados agentes precipitantes acetona, etanol e sulfato de amônio em nove concentrações: 10% (v/v), 20% (v/v), 30%(v/v), 40%(v/v), 50%(v/v), 60%(v/v), 70%(v/v), 80%(v/v) e 90%(v/v) (Pereira et al., 2010). 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 por 24 horas a 4°C e os provenientes da acetona e etanol foram deixados à temperatura ambiente até total evaporação dos solventes. Os sedimentos ressuspensos em água foram utilizados nas análises de teor protéico segundo Bradford, 1976 e de inibição da α -amilase e da tripsina.

4.6.3- 3ª via de purificação: Cromatografia de exclusão molecular

O procedimento foi realizado a 4°C com a coluna de filtração molecular Sephacryl HR300 (1,6 X 60 cm), equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 7.5, até que a leitura em 280 nm permanecesse constante, com valores abaixo de 0,02. As eluições foram feitas com o mesmo tampão.

Para determinação do volume vazio da coluna, foi aplicado 2mL de Blue dextran (PM 2.000KDa) 2mg/mL e as frações coletadas e lidas em espectrofotômetro a 620nm até que a leitura permanecesse constante, com

valores abaixo de 0,02. A solução de Blue dextran e a amostra foram aplicadas no injetor e introduzidos na coluna por arraste pela fase móvel (tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7.5), com o auxílio de uma bomba peristáltica à taxa de 22 mL.h^{-1} . Após a permeação do Blue dextran, efetuou-se a limpeza do gel da coluna bombeando o tampão de eluição por 24 horas.

O extrato de farinha de feijão branco (FFB) utilizado na cromatografia foi preparado segundo a metodologia proposta por Pereira et al. (2010), utilizando-se água como extrator, na proporção de 1:5 seguida de 3 re-extrações, sob agitação por 15 minutos e tratamento a 70°C por 5 minutos com posterior precipitação por variação de pH.

Após a injeção da amostra, o eluato foi continuamente recolhido em frações de 2,0 mL com o auxílio do coletor de frações. A identificação da presença de proteínas nos tubos contendo os permeados foi realizada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 280 nm. As frações obtidas foram submetidas ao ensaio de inibição enzimática da α -amilase e tripsina, e os teores de proteína determinados segundo a metodologia de Bradford (1976).

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).

4.6.4- 4ª via de purificação: Irradiação

A farinha de feijão branco foi irradiada com doses de 2,5 e 5,0 kGy, em um Irradiador Gama de Pesquisa com fonte de césio 137, localizado no Centro Tecnológico do Exército (CTEx), Rio de Janeiro, sendo o tempo de exposição calculado considerando-se a atividade atual da fonte (com taxa de dose de 1,8 kGy/h).

O irradiador é do tipo cavidade com fonte de césio 137 autorecolhível, controlada por um sistema eletro-eletrônico, com portas blindadas móveis. Possui ainda vários sistemas de segurança, que incluem dispositivos lógicos e travas fixas, que garantem o funcionamento seguro, eliminando qualquer possibilidade de exposição acidental à fonte (Lima et al., 2009).

A FFB irradiada foi conduzida ao Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde foram realizadas as análises de inibição enzimática.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- 1ª via de purificação: Tratamento térmico e com variação de pH

O inibidor de α -amilase (α -AI) foi instável ao aumento da temperatura possivelmente ocorrendo desnaturação protéica e perda da função (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagem de inibição da α -amilase após tratamentos térmicos por 15 minutos do EBFFB extraído em diferentes pHs e diluídos 1:10.

pH	Temperaturas				
	70°C	75°C	80°C	85°C	90°C
3,0	59%±1,12	48%±0,44	nd	nd	nd
4,0	69%±0,67	53%±0,89	nd	nd	nd
5,0	76%±2,13	50%±1,12	nd	nd	nd
6,0	75%±4,13	45%±3,54	nd	nd	nd
7,0	75%±0,87	67%±5,12	nd	nd	nd
8,0	72%±1,65	40%±1,23	nd	nd	nd
9,0	63%±1,32	37%±0,98	nd	nd	nd
10,0	64%±0,76	22%±0,55	nd	nd	nd

Os resultados são a média de 3 repetições \pm desvio padrão.

Diluição do extrato bruto de FFB 1:10.

nd corresponde à inibição não detectada.

Pode-se verificar que diferentemente do α -AI (Tabela 1), o inibidor de tripsina permaneceu estável em todos os tratamentos testados (Tabela 2).

Tabela 2: Porcentagem de inibição da tripsina após tratamentos térmicos por 15 minutos do EBFFB extraído em diferentes pHs e diluídos 1:10.

pH	Temperaturas				
	70°C	75°C	80°C	85°C	90°C
3,0	100%	100%	100%	100%	100%
4,0	100%	100%	100%	100%	100%
5,0	100%	100%	100%	100%	100%
6,0	100%	100%	100%	100%	100%
7,0	100%	100%	100%	100%	100%
8,0	100%	100%	100%	100%	100%
9,0	97,2%± 1,3	96,9%± 2,7	96,4%±0,9	96% ± 0,6	95,7% ± 1,3
10,0	91,6 %± 2,1	93,1% ±1,9	92,1%±0,88	91,6% ± 1,2	92,6% ± 1,3

Os resultados são a média de 3 repetições ± desvio padrão.
Diluição do extrato bruto de FFB 1:10

O inibidor de tripsina do feijão é do tipo Bowman-Birk (BBI) e apresenta estrutura compacta e elevada resistência à inativação térmica (Genovese & Lajolo, 2001). Ao contrário do α -AI, que perdeu completamente a atividade inibitória a partir de 15 minutos à 80° C; mesmo a 90°C, o BBI causou uma elevada inibição da atividade da tripsina em todos os pHs testados. Os BBI são moléculas muito resistentes ao calor, força iônica e pH; são pequenos (76 resíduos de aminoácidos), contendo sete pontes dissulfeto e ligações de hidrogênio que permitem uma estrutura muito estável, garantindo suas atividades mesmo em condições desfavoráveis como temperaturas altas e pH drásticos (Amorim, 2009). Além do inibidor de tripsina protéico (BBI) o feijão é rico em taninos, que permanecem ativos, mesmo após o cozimento por 60 minutos e podem atuar como inibidores de tripsina resistentes ao calor (Silva e Silva, 1999). A inibição resistente ao calor pode ser atribuída à presença de polifenóis e à inativação incompleta dos inibidores de tripsina protéicos, sendo a

atividade inibitória final um somatório das duas inibições (Chiaradia e Gomes, 1997).

Pode-se notar uma pequena queda na atividade inibitória da tripsina quando o inibidor foi extraído em pH fortemente alcalino (pH 9,0 e 10,0).

5.2- 2^a via de purificação: Precipitação diferencial

Neste ensaio o objetivo não foi quantificar a inibição, e sim avaliar o comportamento dos inibidores de tripsina e de α -amilase na presença de diferentes agentes precipitantes. A precipitação do inibidor de α -amilase pela adição de solventes orgânicos (acetona e etanol) e de sal (sulfato de amônio) em diversas faixas de saturação foi testada por Pereira et al., 2010. Acreditava-se que diferenças na estrutura e no peso molecular desses inibidores implicariam em um perfil distinto de precipitação, ocasionando a separação dos dois tipos de inibidores. No entanto, pode-se observar na Figura 2, que quando ocorre a precipitação do inibidor de α -amilase, o inibidor de tripsina também precipita em todas as faixas de concentração e agentes precipitantes testados.

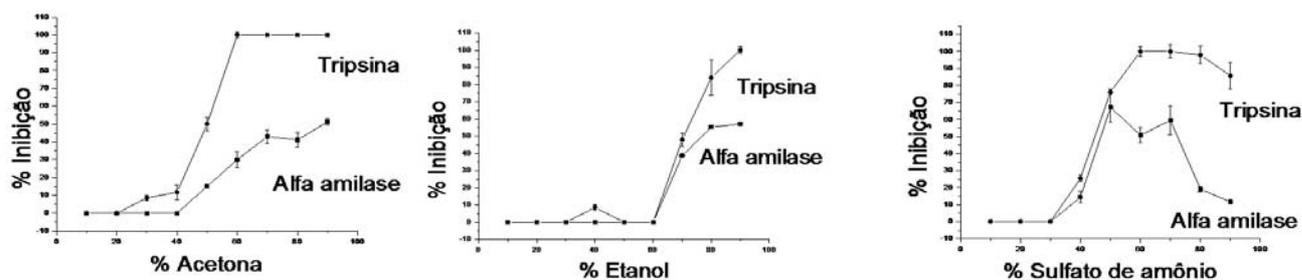


FIGURA 2 Perfil da porcentagem de inibição das enzimas tripsina e α -amilase por inibidores do EBFFB, precipitados por acetona, etanol e sulfato de amônio em 9 concentrações.

Conforme observado, não foi possível remover o inibidor de tripsina do EBFFB por precipitação diferencial.

5.3- 3ª via de purificação: Cromatografia de exclusão molecular

Antes de aplicar a amostra, uma solução de Blue dextran 2mg/mL foi aplicada na coluna Sephacryl HR 300. O cromatograma obtido está exposto na Figura 3.

O movimento da zona de cor azul foi observado e apresentou-se compacto e uniforme. A coluna cromatográfica utilizada apresentou-se homogênea e sem bolhas. Segundo Collins et al. (2007), a homogeneidade da coluna pode ser verificada com uma solução colorida, geralmente Blue Dextran 2000 (Pharmacia- Amersham biosciences), em uma concentração de 2 mg mL⁻¹. O exame da coluna em luz transmitida também permite ver falhas, bolhas de ar, e outros.

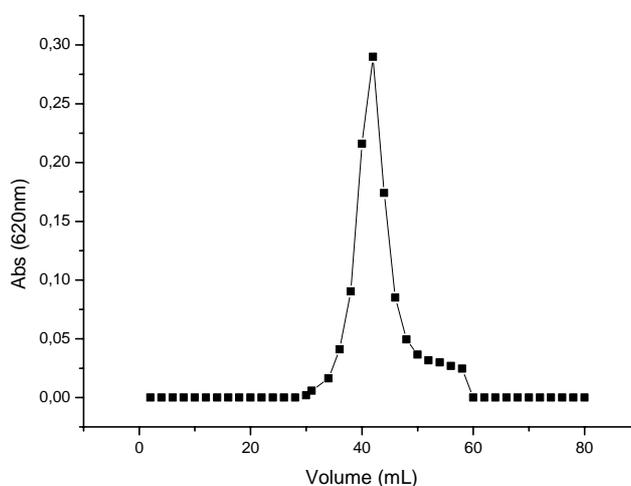


FIGURA 3 Perfil cromatográfico do Blue dextran (PM 2000 KDa) na concentração de 2mg/mL aplicado na coluna Sephacryl HR300 (16X60cm)

Após aplicação do EFFB, os maiores picos de proteína foram observados em 90mL e entre 136 e 174 mL (Figura 4). No entanto, o inibidor de α -amilase foi completamente eluído entre 114 e 130mL (Figura 5).

As frações contendo o inibidor de α -amilase foram testadas também quanto à inibição da atividade de tripsina. O α -AI de feijão branco possui PM estimado entre 30 a 36 KDa (Yang et al, 2008, Pusztai et al., 1995, Pueyo et al., 1993) e entre 45 e 50 kDa (Lee et al., 2002, Marshall e Lauda, 1975, Yamaguchi, 1993) e o inibidor de tripsina protéico Bowman-Birk (BBI), PM de 8 a 9kDa (Amorim, 2009, Cardénas, 2006, Pusztai et al., 1995).

Apesar da diferença de tamanho entre o α -AI e o BBI, nas frações contendo o α -AI, a tripsina foi 100% inibida, denotando a presença do inibidor de tripsina e não somente o de α -amilase.

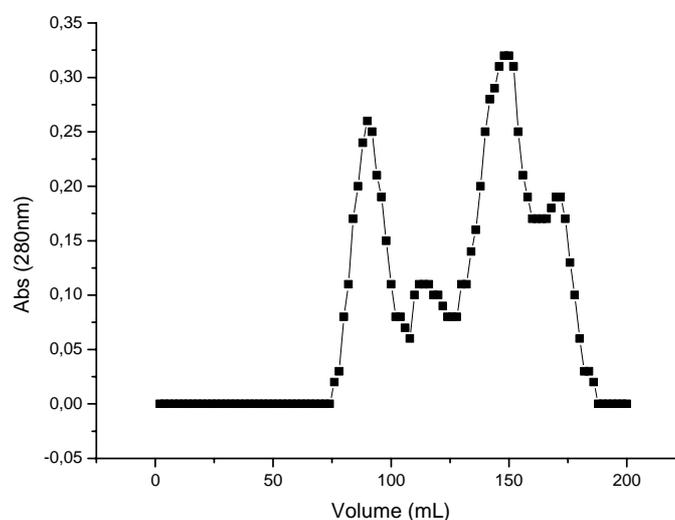


FIGURA 4 Perfil cromatográfico da eluição de proteínas a 280nm da solução de FFB aplicada na coluna Sephacryl HR300 (16X60cm).

Os BBI apresentam estrutura em cadeia única, rica em resíduos de cisteína que lhes confere uma estrutura rígida e bastante conservada. As principais enzimas inibidas por BBI são tripsina e quimotripsina, uma vez que sua estrutura possui dois loops ou duas “cabeças de inibição”, sendo uma para a tripsina e outra para a quimotripsina. Além dessas enzimas, os BBI podem inibir ainda a catepsina G, a elastase e a quinase (Amorim, 2009).

Algumas proposições podem sugerir a eluição conjunta dos inibidores das enzimas α -amilase e tripsina.

Apesar da diferença de tamanho entre os inibidores de BBI e α -AI, a coluna Sephacryl HR 300, possui poros que retêm proteínas globulares com PM na faixa entre 10 a 1500 kDa. Esperava-se que o α -AI fosse eluído antes do BBI, já que na cromatografia por exclusão molecular, as moléculas se separam de acordo com seus tamanhos e pesos moleculares; moléculas maiores eluem primeiro da coluna, enquanto moléculas menores eluem no final da permeação (Silva e Cabello, 2006). Segundo Collins et al. (2007), se o limite de exclusão molar do gel está muito acima da maior massa molar, a resolução diminui, o que pode ter acontecido neste caso.

Deve-se considerar ainda que há relatos de inibidores duplos de α -amilase e tripsina. Dentre os α -AI de origem vegetal tem-se: knotinas, γ -tioninas, proteínas-CM, inibidores tipo-Kunitz, taumatinas e lectinas. As proteínas-CM possuem até 160 resíduos de aminoácidos. Geralmente têm atividade não somente sobre α -amilases como também sobre tripsinas, ao contrário de outros inibidores que apresentam especificidade apenas sobre amilases (Svensson et al., 2004). Já é conhecida a presença de α -AI do tipo lectinas no feijão branco, porém, a presença de inibidores do tipo proteínas-CM ainda não foi sugerida.

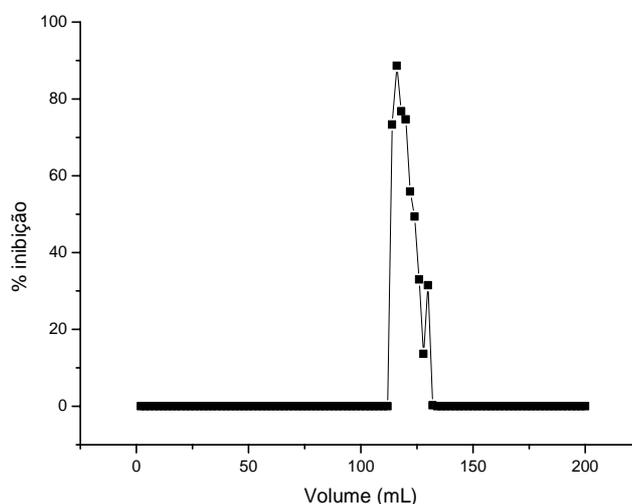


FIGURA 5 Porcentagem de inibição da α -amilase nas frações coletadas por cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl HR300 (16X60cm).

Finalmente, pode-se sugerir que os α -AI, que são processados para a forma ativa por meio de modificações pós-traducionais, como clivagem proteolítica e glicosilações, para originar a estrutura heterotetramérica com 2 cadeias α e duas cadeias β , tenham sido hidrolisados, originando as subunidades α e β , com 7,8 e 14 KDa, respectivamente (Del Sarto et al., 2007). As subunidades possuem PM muito próximo ao do BBI, e neste caso, eluiriam juntos da coluna.

Com relação ao rendimento da purificação, o EFFB apresentou uma inibição específica de 0,473UIA/mg de proteína antes da cromatografia. As proteínas provenientes das frações contendo o inibidor apresentaram uma inibição específica de 9,26 UIA/mg de proteína, e conseqüentemente um fator de purificação de 19,58 (Tabela 3). No entanto, a purificação do α -AI foi parcial, dada a presença de inibição da atividade de tripsina nas frações coletadas.

Tabela 3 Etapas da purificação parcial do inibidor de α -amilase da farinha de feijão branco.

Etapa da purificação	UIA/g* de proteína	Fator de Purificação
Extrato bruto	0,473	1
Tratamento térmico 70°C 5 min.	0,504	1,06
Precipitação isoelétrica	2,079	4,39
Cromatografia de filtração molecular	9,26	19,58

* UIA/g: unidade de inibição da α -amilase corresponde à inibição total de 1 U de α -amilase por grama de proteína da FFB, sendo que (U) corresponde à formação de um μ mol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio.

5.4- 4ª via de purificação: Irradiação

No Brasil, a irradiação de alimentos é permitida mediante o decreto nº 72718 de 29 de agosto de 1973. Conforme a Resolução-RDC N° 21 de 26/01/2001, qualquer alimento pode ser tratado com a radiação ionizante considerando que a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida e, a dose máxima deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e ou os atributos sensoriais do alimento (Huachaca, 2002). Em 1980, o Comitê de Especialistas sobre Irradiação de Alimentos da FAO/IAEA/OMS concluiu que "*...a irradiação de qualquer item de alimento com dose média de até 10 kGy não apresenta dano toxicológico e não introduz problema especial nutricional ou microbiológico*" (WHO, 1981). A partir daí, a Comissão do *Codex Alimentarius* da FAO/OMS adotou, em 1983, o *Codex General Standard* para Alimentos Irrradiados, limitando a dose média a 10 kGy (FAO, 1984).

O efeito da irradiação- γ na inibição de α -amilase e tripsina por extrato de farinha de feijão branco está demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 Efeito da irradiação- γ na inibição de α -amilase e tripsina por extrato de farinha de feijão branco.

Dose irradiada (kGy)	% inibição da α -amilase*	% inibição da tripsina
Controle	66,7% ^a	100%
2,5	52,5% ^b	100%
5,0	55,4% ^b	100%
CV	8,41	0

CV: coeficiente de variação.

Diluição do extrato bruto de FFB 1:25.

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

Pode-se verificar que o inibidor de tripsina não foi alterado e a inibição da α -amilase foi diminuída após a radiação nas doses testadas. Esperava-se uma queda da atividade inibitória da tripsina, já que tem sido atribuída uma perda da ação do inibidor em amostras irradiadas pela clivagem das ligações dissulfeto (Armelin et al., 2007). Há relatos de degradação dos inibidores de protease expostos à radiação γ , diretamente proporcional à dose. Tem sido reportada uma relação linear significativa entre a perda da atividade inibitória de tripsina e o aumento da dose de radiação em grão de bico. Na soja, constatou-se uma queda de 54,5%, 62,7% e 72,5%, na inibição da tripsina *in vitro* após uma exposição à radiação nas doses de 10 kGy, 30 kGy e 60 kGy, respectivamente (Siddhuraju et al., 2002). No entanto, doses acima de 10 kGy não são recomendadas (Armelin et al., 2007).

Houve uma diminuição da inibição da α -amilase após a radiação, e o aumento da dose utilizada não interferiu nesta queda. A perda da inibição da α -amilase também foi observada após exposição da farinha desengordurada de *Moringa peregrina* a doses de 7 e 10 kGy. Neste caso, a queda da atividade

inibitória da α -amilase após o tratamento com irradiação com 7 kGy foi semelhante ao tratamento térmico a 70°C por 120min (Siddhuraju et al., 2002).

A irradiação, apesar de mostrar-se uma prática promissora, utilizada para estender a vida-de-prateleira e reduzir as perdas das safras, durante a armazenagem do feijão (Mechi et al., 2005), não configurou-se uma opção vantajosa para utilização da farinha com efeito fitoterápico; já que reduz a inibição desejável da α -amilase sem interferir na inibição da tripsina.

6 CONCLUSÕES

Nenhuma das vias de purificação propostas eliminou a inibição da tripsina. No entanto, a cromatografia de exclusão, precedida pela extração, tratamento térmico a 70°C e precipitação isoelétrica apresentou um fator de purificação de 19,58.

7 REFERÊNCIAS

ARMELIN, J. M.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; PIEDADE, S. M. S.; MACHADO, F. M. V. F.; SPOTO, M. H. F. Avaliação física de feijão carioca irradiado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.3, p. 498-502, jul.-set. 2007.

AMORIM, L. L. **Formas reduzidas de inibidor Bowman-Birk, biodisponibilidade em óleo isolado de camundongo e atividade no proteassoma**. 2009, 78p. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

CARDÉNAS, L. L. A. R. **Disponibilidade de zinco e de ferro, valor nutricional e funcional de diferentes cultivares de feijão comum submetidos à tratamentos domésticos**. 2006, 171p. Tese (doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

CARDÉNAS, L. L. A. R.; LEONEL, A. J.; COSTA, N. M. B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n.28, v.1, p. 200-213, jan.-mar. 2008.

CHEN, X.; XU, G.; LI, X.; LI, Z.; YING, H. Purification of an α -amylase inhibitor in a polyethylene glycol/fructose-1,6- biphosphate trisodium salt aqueous two-phase system. **Process Biochemistry**, London, v. 43, n. 7, p. 765-768, July 2008.

CHIARADIA, A. C.; GOMES, J. C. **Feijão: química, nutrição e tecnologia**. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 1997. 180p.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2007. 453p.

COSTA, G. E. A.; MONICI, K. S. Q.; REIS, S. M. P. M.; OLIVEIRA, A. C. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. **Food Chemistry**, Easton, v. 94, n. 3, p. 327-330, Feb. 2006.

DEL SARTO, R. P. **Variantes de inibidores de alfa amilase selecionados por Phage Display com atividade para alfa amilases do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Coleoptera: Curculionidae)**. 2007, Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 95, p. 271-278, Nov. 1961.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Atividade inibitória de tripsina do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): avaliação crítica dos métodos de determinação. **Arquivos Latino Americanos de Nutrição**, Caracas, v.51, n.4, p.386-394, 2001.

HUACHACA, N. S. M.; LAMY-FREUND, M. T.; MANCINI-FILHO, J.; DELINCÉE, H.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Detection of irradiated fresh fruits treated by e-beam or gamma rays. **Radiation Physics and Chemistry**, Melbourne, v.63, n.3-6, p. 419-422, Mar. 2002.

LEE, S.; GEPTS, P. L.; WHITAKER, J. R. Protein Structures of common bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, n. 22, p.6618-6627, Sep. 2002.

LIMA, A. L. S.; LIMA, K. S. C.; COELHO, M. J.; SILVA, J. M.; GODOY, R. L. O.; PACHECO, S. Avaliação dos Efeitos da Radiação Gama nos Teores de Carotenóides, Ácido Ascórbico e Açúcares do Fruto Buriti do Brejo (*Mauritia flexuosa* L.). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n.3, p. 649 – 654, Sept. 2009.

MARSHALL, J. J.; LAUDA, C. M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α -amylase from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 250, n. 20, p. 8030-8037, Oct. 1975.

MECHI, R.; CANIATTI-BRAZACA, S. G.; ARTHUR, V. Avaliação química, nutricional e fatores antinutricionais do feijão preto (*Phaseolus Vulgaris* L.) irradiado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.1, p.109-114, jan.-mar. 2005.

NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques - III la β -amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amylase. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 31, n. 1, p. 286-290, 1948.

PEREIRA, L. L. S.; SANTOS, C. D.; CORREA, A. D.; SOUSA, R. V. Estudo comparativo entre inibidor de α -amilase (Faseolamina) comercial e farinha de feijões branco, preto e carioca. **Infarma**, Brasília, v.21, n 11/12, p. 11-14, Nov. 2009.

PEREIRA, L. L. S.; SANTOS, C. D.; PEREIRA, C. A.; MARQUES, T. R.; SATIRO, L. C. Precipitação do inibidor de α -amilase de feijão branco: avaliação dos métodos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.21, n.1, p. 15-20, jan./mar. 2010.

PUEYO, J. J.; HUNT, D. C.; CHRÍSPEELS, M. J. Activation of bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor requires proteolytic processing. of the proprotein. **Plant Physiology**, Bethesda, v.101, n.4, p.1341-1348, Apr. 1993.

PUSZTAI, A.; GRANT, G.; DUGUID, T.; BROWN, D. S.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; BARDOCZ, S. Inhibition of starch digestion by α -amylase inhibitor reduces the efficiency of utilization of dietary proteins and lipids and retards the growth of rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 6, p. 1554-1562, Jan. 1995.

SIDDHURAJU, P.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The effect of ionising radiation on antinutritional factors and the nutritional value of plant materials with reference to human and animal food. **Food Chemistry**, New York, v.78, n.2, p. 187-205, Aug. 2002.

SILVA, F. I.; CABELLO, C. Caracterização das estruturas moleculares de amido de mandioca utilizando metodologia de permeação em gel. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v.21, n.1, p. 50-68, 2006.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos Nutricionais de Fitatos e Taninos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.1, p.5-19, jan./abr. 1999.

SVENSSON, B.; KENJI, F. NIELSEN, P. K.; BONSAGER, B. C. Proteinaceous α -amylase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1696, n.2, p. 145-156, Feb. 2004.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Genebra, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 12 jan. 2011.

YAMADA, T.; HATTOR, K.; ISHIMOTO, M. Purification and characterization of two α -amylase inhibitor from seeds of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). **Phytochemistry**, New York, v. 58, p.59-99, Mar. 2001.

YAMAGUCHI, H. Isolation and characterization of the subunits os a heath-labile α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. white kidney bean. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v.2, n.57, p. 297-302, Sep. 1993.

YANG, M. Y.; ZHANG, X. Q.; MA, Y.; SHEN, J.; SONG, J. R.; ZHU, H. L. Purification and parcial characterization of a glycoprotein alpha-amylase inhibitor from white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*. L). **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 32, n. 1, p. 72-84, Fev. 2008.

**AÇÃO INIBITÓRIA E ESTABILIDADE DO EXTRATO DE FARINHA
DE FEIJÃO BRANCO SOBRE ENZIMAS DIGESTIVAS NA PRESENÇA
DE FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO**

Luciana L. S. Pereira*, Custódio D. Dos Santos¹, Livia C. Sátiro², Silvana Marcussi³; Chrystian A. Pereira⁴; Stefânia P. De Souza⁵

* Farmacêutica-bioquímica; doutoranda do Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, CP 3037, 37200-000 Lavras-MG, Brasil.

¹ Docente orientador do Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, CP 3037, 37200-000 Lavras-MG, Brasil.

² Aluna de graduação, bolsista de iniciação científica do Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, CP 3037, 37200-000 Lavras-MG, Brasil.

³ Docente pesquisadora do Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, CP 3037, 37200-000 Lavras-MG, Brasil

⁴ Farmacêutico-bioquímico, docente colaborador do Instituto Federal do Sul de Minas, Campus Muzambinho, Estrada de Muzambinho, KM 35, CP 02, 37890-000, Muzambinho-MG, Brasil.

⁵ Doutoranda do Departamento de Química, Instituto Militar de Engenharia, Praça General Tibúrcio, 80, 22290-070 Rio de Janeiro-RJ, Brasil

CORRESPONDÊNCIA: Luciana Lopes Silva Pereira
lucianalps@yahoo.com.br;

Submetido para Revista Brasileira de Farmácia em 13 de janeiro de 2011.

Artigo redigido conforme norma da revista. Este artigo é uma versão preliminar, considerando que o conselho editorial da revista poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu estilo próprio.

1 RESUMO

Objetivou-se realizar ensaios de inibição de enzimas envolvidas na digestão de carboidratos (α -amilase e α -glicosidase) e de lipídios (lipase pancreática), pela farinha de feijão branco (FFB), visando detectar inibidores, e verificar a estabilidade destes frente ao fluido gástrico simulado, além de realizar uma triagem toxicológica pela análise de atividade hemolítica. Após a simulação do fluido gástrico as enzimas α -amilase e α -glicosidase foram inibidas pela FFB, revelando-se um importante auxiliar na redução da absorção de carboidratos da dieta, e conseqüentemente um promissor complemento ao tratamento da obesidade e do diabetes. Adicionalmente, não foi verificada ação hemolítica nos ensaios preliminares de toxicidade.

Descritores: α -amilase, α -glicosidase, lipase.

2 ABSTRACT

The objective was to perform tests of inhibition of enzymes involved in digestion of carbohydrates (α -amylase and α -glucosidase) and lipids (lipase pancreatic) using the white bean flour (WBF), in order to detect inhibitors and to verify the stability of these front the simulated gastric fluid, and a toxicological screening analysis by hemolytic activity. After simulation of gastric fluid the enzymes α -amylase and α -glucosidase were inhibited by WBF, revealing an potential of reduction of the absorption of carbohydrates in the diet, and consequently an adjunct to treatment of obesity and diabetes. Additionally, there was no hemolytic action in preliminary toxicity tests.

Keywords: α -amylase, α -glucosidase, lipase.

3 INTRODUÇÃO

A obesidade vem crescendo acentuadamente ao redor do mundo nos últimos anos e os potenciais riscos de sua prevalência e progressão envolvem as dislipidemias, hipertensão, doenças coronarianas, diabetes, entre outras.^{1,2,3}

Atualmente, estão disponíveis diversos produtos para o controle do peso e diminuição da glicemia, incluindo preparações farmacológicas e suplementos dietéticos, que objetivam restringir a absorção de energia, sendo a maioria constituída de extratos vegetais.^{4,5} Especial atenção tem sido dada recentemente aos chamados “bloqueadores de amido”, embora não haja evidências científicas confiáveis da sua eficácia.⁶ Estes suplementos consistem de concentrados protéicos de feijão, que são conhecidos por conter altos níveis de inibidor de α -amilase, uma proteína conhecida como Faseolamina (α -AI). Além de ser uma fonte de nutrientes essenciais, o feijão possui constituintes químicos que são considerados componentes com ação funcional, como os flavonóides, incluindo flavonóis, glicosilados ou não, antocianidinas, proantocianidinas e isoflavonas, bem como ácidos fenólicos.⁷ Cabe aqui ressaltar que, alimento funcional é um “alimento convencional ou similar a este em aparência, consumido como parte da dieta normal, que apresenta efeitos fisiológicos benéficos e/ou reduz o risco de doenças crônicas, além de suas funções nutricionais básicas”. Estudos realizados com diversas variedades de feijão demonstraram o seu potencial como alimento funcional, devido a sua ação na diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares, redução no índice glicêmico para portadores de diabetes, aumento na saciedade e na prevenção do câncer.⁸ Acredita-se que, por eventualmente impedir a digestão dos carboidratos complexos, este inibidor possa reduzir a disponibilidade calórica e de açúcares simples para serem absorvidos, promovendo assim a perda de peso e uma diminuição da glicemia.⁹

A prospecção de alternativas terapêuticas, principalmente de origem vegetal, apresenta-se como opção promissora para a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos, visto que a grande diversidade de espécies vegetais ainda não estudadas representa um vasto campo de moléculas a serem descobertas.¹⁰ Nesse contexto, alvos moleculares como enzimas e receptores têm sido estudados para a busca de medicamentos, baseados no mecanismo de inibição enzimática que ocasiona alterações benéficas no metabolismo e o uso no tratamento de doenças.¹¹

As enzimas amilase e glicosidases são responsáveis pelo processamento de carboidratos provenientes da dieta, atuando na quebra do amido e na absorção de monossacarídeos pelos enterócitos. Dessa forma, inibidores dessas enzimas, presentes em plantas oferecem uma estratégia promissora para o controle da hiperglicemia associada ao diabetes tipo 2, obesidade e hipertensão por meio da redução da quebra do amido e da absorção da glicose no intestino.¹²

Adicionalmente, a lipase envolvida no metabolismo de lipídeos apresenta-se também como interessante alvo de inibidores, uma vez que sua inibição promove redução na absorção de triglicerídeos da dieta, ocasionando diminuição do aproveitamento calórico e perda de peso.¹¹

Diante do exposto, o objetivo neste trabalho foi realizar ensaios de inibição de enzimas envolvidas na digestão de carboidratos (α -amilase e α -glicosidase) e de lipídios (lipase pancreática), com extrato bruto de farinha de feijão branco (FFB), visando detectar a atividade de inibidores, e verificar a estabilidade destes frente a um fluido gástrico simulado. Além de se realizar uma prévia triagem toxicológica da FFB pela análise de atividade hemolítica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da farinha de feijão branco (FFB) e preparo do extrato

O feijão branco foi cultivado em Campo Belo, MG, e adquirido em supermercado local. Os grãos com casca foram lavados com água destilada, e secos em estufa com circulação de ar a 30°C até peso constante. Para obtenção da farinha (FFB), os grãos foram triturados em moinho manual e em seguida em um moinho de facas (TE 631 Tecnal) para obtenção de uma farinha com granulometria menor ou igual a 60 mesh.

As amostras foram misturadas com água destilada na proporção 1:5 (p/v) e colocadas em agitador horizontal à temperatura ambiente durante 1 hora. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 2.500 x g. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, denominado extrato bruto de farinha de feijão branco (EBFFB), utilizado nas análises de inibição das enzimas.

4.2 Obtenção das enzimas

Foram utilizadas nos ensaios a enzima α -amilase pancreática suína do tipo VI (SIGMA) e lipase suína tipo II (MERCK). As α -glicosidases foram obtidas a partir de duodeno suíno fresco cedido pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras. O tecido foi triturado em liquidificador com tampão Tris-HCl 0,5 mol L⁻¹, pH 8,0 a 4°C, para extração das enzimas das membranas dos enterócitos e processado em “mixer” até completa homogeneização. O homogeneizado foi filtrado em malha de nylon e centrifugado por 10 minutos, a 2.500 x g, a 4°C e utilizado como extrato enzimático.

4.3 Atividade das enzimas glicolíticas

4.3.1 Atividade de α -amilase

A atividade de α -amilase foi determinada segundo a metodologia proposta por Noelting & Bernfeld (1948)¹³ em que 50 μL da amostra e 50 μL de enzima α -amilase são pré-incubados, por 20 minutos, em banho-maria a 37°C. O substrato foi o amido 1% preparado em tampão Tris 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 acrescido de NaCl 38 mmol L⁻¹ e CaCl₂ 0,1 mmol L⁻¹. Após adição de 100 μL do substrato, a mistura foi incubada por quatro períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 min.). A reação foi interrompida adicionando-se 200 μL do reagente ácido 3,5 dinitrosalicílico e a absorbância, do produto da mesma, lida em espectrofotômetro a 540 nm.

4.3.2 Atividade de α -glicosidase

A atividade de α -glicosidase foi determinada segundo Kwon et al. (2006)¹², utilizando *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo 5 mmol L⁻¹ em tampão citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 como substrato. No ensaio, 50 μL da amostra, 100 μL de enzima e de 50 μL do substrato foram incubados em banho-maria, a 37°C, por quatro períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 min.). A reação foi interrompida adicionando-se 1 mL de NaOH 0,05 mol L⁻¹ e a leitura da absorbância, do produto da mesma, aferida em espectrofotômetro, a 410 nm.

4.3.3 Atividade de lipase

Em cada análise, a mistura de 100 μL de lipase, 50 μL de EBFFB e 50 μL de substrato *p*-nitrofenilpalmitato 8 mmol L⁻¹ em tampão Tris-HCl 0,05 mmol L⁻¹ pH 8,0 contendo 0,1% de Triton-X100 foi incubada por quatro períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 min.). A reação foi paralisada, transferindo-

se os tubos para um banho de gelo e adicionando-se 1mL de tampão Tris-HCl 0,05 mmol L⁻¹ pH 8,0. O *p*-nitrofenol (produto da ação da lipase sobre o *p*-nitrofenilpalmitato) de coloração amarela foi lido em espectrofotômetro a 410 nm.¹⁴

4.4 Determinação da inibição

A inibição das enzimas foi obtida a partir da determinação das inclinações das retas (absorbância x tempo) dos ensaios de atividade das enzimas controle (sem amostra) e enzimas + inibidor (com amostra). A inclinação da reta é decorrente da velocidade de formação de produto por minuto de reação e a presença do inibidor ocasiona uma diminuição nessa inclinação. A partir dessa inclinação, os valores de absorbância foram convertidos em μ mol de produto por meio de uma curva padrão de glicose para a amilase e de *p*-nitrofenol para as glicosidases e para lipase. Para uma maior segurança dos resultados os controles foram preparados em água e em fluido gástrico simulado neutralizado, para eliminar a possível interferência deste na atividade das enzimas.

4.5 Fluido gástrico simulado

Com o objetivo de simular o processo de digestão no estômago *in vitro*, foram também realizados os ensaios de atividades enzimáticas na presença de um fluido gástrico simulado. Para tal, o extrato de FFB foi incubado com o fluido gástrico simulado na proporção 1:1, preparado segundo a The United States Pharmacopeia - USP¹⁵ por 1 hora em banho-maria, a 37°C. Após esse período, o EBFFB em fluido foi neutralizado com bicarbonato de sódio sólido até pH 7,4 e só então realizados os ensaios de atividade.

4.6 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi realizada utilizando placas de ágar Sangue (AS) 5% v/v, acrescidas com 0,01% de azida de sódio para evitar a proliferação de microorganismos. Amostras contendo 40µL de solução aquosa de FFB em 7 concentrações (65mg/mL, 90mg/mL, 115mg/mL, 140mg/mL, 165mg/mL, 190mg/mL e 215mg/mL) e o controle positivo (Triton X-100 a 1%) foram inoculados em orifícios feitos no gel. Cada concentração da solução de FFB e o controle positivo foram inoculados em triplicata nas placas, sendo estas incubadas a 37°C por 24h. A atividade hemolítica é caracterizada pela presença de halo de hemólise radial representada pela descoloração do gel ao redor do local de inoculação das amostras. A medida do diâmetro das circunferências descoloridas foi utilizada para a determinação da atividade hemolítica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade das enzimas glicolíticas e da lipase na presença do extrato bruto de FFB

Os resultados de inibição enzimática do EBFFB são apresentados na Tabela 1. A inibição expressa em porcentagem é relativa à atividade da enzima na presença do extrato bruto de FFB com uma diluição que resulte em uma inibição entre 60 e 80% para garantir a confiabilidade dos resultados. Adicionalmente, a inibição foi também calculada em unidades de inibição; que representa a atividade de enzima inibida por grama de FFB.

Tabela 1 Inibição das enzimas digestivas α -amilase, α -glicosidase e lipase pelo extrato bruto de FFB, com ou sem incubação do extrato com fluido gástrico simulado.

Enzima	Incubação	% Inibição*	Unidade de inibição*
α -amilase***	com fluido gástrico	79,1±2,49	58,8±3,89
	sem fluido gástrico	81,8±1,33	54,1±2,76
α -glicosidase**	com fluido gástrico	70,0	530
	sem fluido gástrico	0	0
Lipase**	com fluido gástrico	0	0
	sem fluido gástrico	0	0

*Unidade de inibição por g de FFB (UI/g FFB). Média de 5 repetições \pm desvio padrão

** Diluição do extrato bruto de FFB 1:5

*** Diluição do extrato bruto de FFB 1:10

Expressando a inibição de α -amilase em porcentagem, verifica-se 79,1% e 81,81% com e sem exposição do extrato ao fluido gástrico, respectivamente. Já

para α -glicosidase a inibição foi de 70%, detectada apenas após a ação do fluido gástrico (Tabela 1). Tais percentuais estão dentro da faixa considerada como um bom perfil inibitório de enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos.¹²

Venkateswaran et al.¹⁶ constataram uma redução significativa dos níveis séricos de colesterol, triglicérides, ácidos graxos livres, colesterol total e VLDL em ratos tratados com extrato aquoso de *Phaseolus vulgaris* por 45 dias. Em adição, vários autores relataram atividade antihiperlipidêmica atribuída ao feijão branco.^{16,17,18,19} Contudo, neste trabalho, não foi detectada inibição da enzima lipase pancreática, envolvida no metabolismo lipídico, pela FFB, que poderia explicar eventuais reduções de lipídeos sanguíneos. Assim, outros mecanismos podem ser sugeridos para promoção deste efeito, que não a inibição da lipase pancreática: inibição da HMG-CoA redutase, estimulação da colesterol-7- α -hidroxilase (CYP7A1), que converte o colesterol em ácidos biliares, e/ou inibição da absorção do colesterol no intestino pela formação de complexos com compostos como os glicosídeos e as saponinas.²⁰

Para a α -glicosidase, a exposição ao fluido gástrico ativou o inibidor; que não havia atuado sobre a enzima antes da simulação do fluido, conforme demonstrado na Figura 1. Tal fato sugere que o inibidor sofra alteração estrutural como a hidrólise de ésteres devido à alteração do pH. A hidrólise ocorre pela desestabilização da carbonila do grupo éster pelo íon hidrogênio (H^+). Desta forma, a exposição das moléculas ao fluido gástrico pode acarretar modificações na estrutura do inibidor em decorrência do pH ácido e, neste caso, promove a inibição da enzima que antes da simulação do fluido gástrico não ocorria.

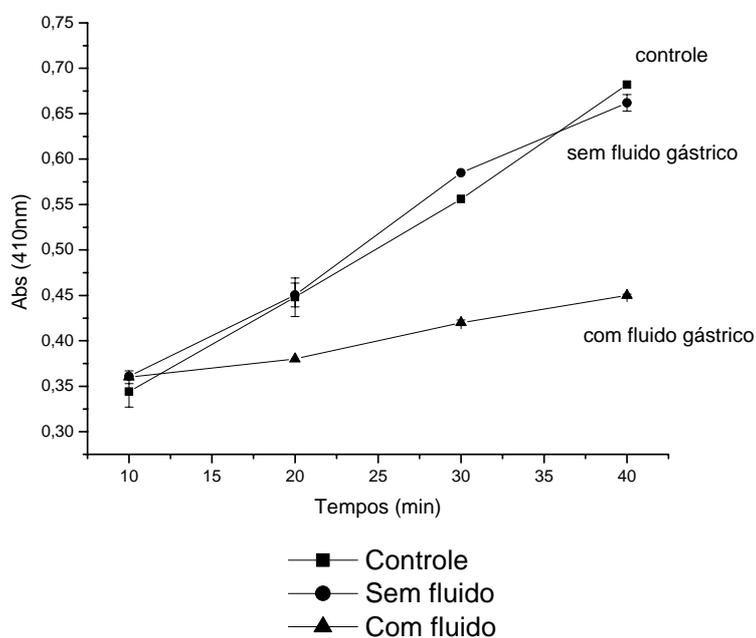


Figura 1 Atividade da α -glicosidase na ausência do EBFFB (controle) e na presença do EBFFB com e sem exposição ao fluido gástrico simulado.

Apesar de haver muitos inibidores protéicos de α -amilases descritos e bem caracterizados, sua potencial aplicação farmacológica como auxiliar no tratamento de obesidade, diabetes ou outros distúrbios pode ser questionada. A dúvida é se as proteases e o pH ácido do fluido gástrico poderiam clivar as ligações peptídicas destes inibidores protéicos, levando à perda da atividade antes que a ação terapêutica ocorresse, como acontece em insetos.²¹ A simulação do fluido gástrico mostrou que a inibição da α -amilase não foi alterada nas proporções utilizadas durante os ensaios conforme demonstrado na Figura 2. Desta forma, sugere-se que o inibidor continuaria estável após a passagem pelo estômago durante a digestão.

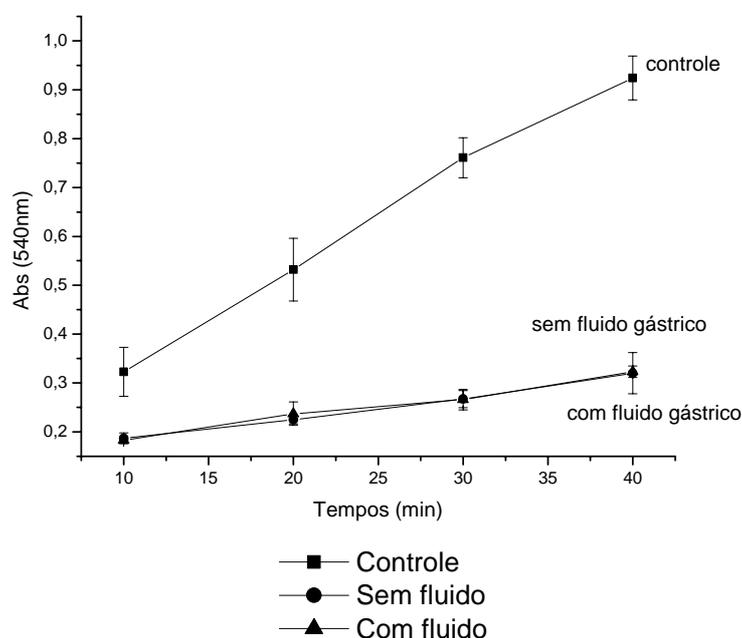


Figura 2 Atividade da α -amilase na ausência do EBFFB (controle) e na presença do EBFFB com e sem exposição ao fluido gástrico simulado.

A inibição das enzimas glicolíticas pode ser potencialmente utilizada como uma terapia complementar efetiva para hiperglicemia pós-prandial, com a vantagem de apresentar menos efeitos colaterais decorrentes da excessiva inibição de α -amilase pancreática sem a inibição da α -glicosidase, que resulta em aumento da fermentação bacteriana anormal de carboidratos não digeridos no cólon.¹² Além disso, a forte inibição da α -glicosidase, não associada à inibição da α -amilase, provoca acúmulo excessivo de oligossacarídeos, como os dissacarídeos no intestino distal, resultando na alteração dos fluidos osmóticos e em distúrbios intestinais que podem reduzir o tempo de contato entre a mucosa e os nutrientes existentes no intestino.²² Diarréias e outros efeitos colaterais, como flatulência e cólica abdominal estão associados ao uso desses inibidores, além do desenvolvimento de tumores renais e danos hepáticos.²² Desta forma, a FFB é

promissora; já que inibe a α -amilase ($58,8 \pm 3,89$ UIA/g FFB), e a α -glicosidase (530 ± 0 UIG/g FFB) após a simulação do fluido gástrico.

No ocidente os carboidratos correspondem de 40 a 50% das calorias ingeridas e constituem o principal componente da dieta na forma de amido ou de açúcares simples.²³ Verifica-se, positivamente, que o extrato bruto de FFB pode apresentar efeito na diminuição da absorção de carboidratos *in vivo* por inibição de enzimas envolvidas na digestão. A presença dessa atividade inibitória pode explicar, portanto, parte dos efeitos emagrecedor e hipoglicemiante, atribuídos à FFB, relatados na literatura.²²

5.2 Avaliação toxicológica preliminar

O teste para verificação da ação hemolítica *in vitro* tem sido utilizado como uma das metodologias de triagem para diversos agentes tóxicos, sendo empregado por diversos autores para a avaliação toxicológica de plantas.^{24,25,26}

A saponina é um surfactante natural e foi detectada em feijões Kidney (*Phaseolus vulgaris*), conjugada com o DDMP (2,3-diidro-2,5,diidroxi-6-metil-4H-pirano-4-one).²⁷ Os compostos surfactantes produzem efeito hemolítico por dois possíveis mecanismos. Um dos mecanismos propostos é a ocorrência de solubilização da membrana plasmática do eritrócito, que romperia por se tornar mais frágil. Outra hipótese é a ocorrência de lise osmótica, por meio da alteração da permeabilidade da membrana plasmática da hemácia.²⁸

Por outro lado, os compostos xenobióticos reduzidos, como, por exemplo, os compostos fenólicos, são capazes de promover hemólise por meio da oxidação da hemoglobina, formando metemoglobina.²⁹ Segundo Cardénas²⁷ o feijão branco cru apresenta teor de catequina de aproximadamente 33,38mg/100g de feijão, valores bem inferiores aos encontrados nos feijões preto e carioca (61,01mg/100g e 102,45mg/100g, respectivamente).

Apesar da presença de agentes hemolíticos como as saponinas e compostos fenólicos, constatou-se que o EBFFB, quando inoculado em placas de AS, não apresentou atividade hemolítica em todas as concentrações testadas, sendo que a maior concentração usada correspondeu a um valor 10 vezes maior que a dose indicada para consumo humano. Por outro lado, o uso de solução de Triton X100 a 1%, como controle positivo, promoveu halo de hemólise com diâmetro de de 5,7 mm; validando o processo, evitando resultados falso negativos. Entretanto, o teste de hemólise *in vitro* serve apenas como triagem para avaliação de toxicidade, sendo ainda necessária a realização de análises complementares, como por exemplo, ensaios biológicos com animais.

6 CONCLUSÕES

Após a simulação do fluido gástrico as enzimas glicolíticas (α -amilase e α -glicosidase) foram inibidas pela FFB, que revelou ser um potencial redutor da absorção de carboidratos da dieta, e conseqüentemente um promissor adjuvante ao tratamento da obesidade e do diabetes. Adicionalmente, não foi verificada ação hemolítica nos ensaios preliminares de toxicidade.

8 REFERÊNCIAS

- 1 Mosca, M; Boniglia, C; Carratu, B; Giammarioli, S; Nera, V; Sanzini, E. **Determination of α -amilase activity of phaseolamin from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in dietary supplements by HPAEC-PAD.** *Anal. Chim. Acta.* 2008, 617 (1/2): 192–195.
- 2 Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. São Paulo, 2009. Disponível em: <[http. www.abeso.org.br](http://www.abeso.org.br)>. Acesso em: dez. 2010.
- 3 Organização Pan-Americana da Saúde. **Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde.** Brasília, DF, 2003. 60 p.
- 4 Pittler, MH; Ernst, E. **Dietary supplements for body-weight reduction: a systematic review** *Am J Clin Nutr.* 2004, 79 (4):529–536.
- 5 Dwyer, JT; Allison, DB; Coates, PM. **Dietary supplements in weight reduction.** *J Am Diet Assoc.* 2005, 105 (5): 80–86.
- 6 Udani, J; Hardy, M; Madsen, DC. **Blocking carbohydrate absorption and weight loss: a clinical trial using Phase 2™ Brand proprietary fractionated white bean extract.** *Altern Med Rev.* 2004; 9 (52): 63-69.
- 7 Lin, LZ; Harnly, J M; Pastor-Corrales, MS; Luthria, DL. **The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).** *Food Chem.* 2008, 107 (1): 399-410.
- 8 Lião, LM; Choze, R; Cavalcante, PPA; Santos, SC; Ferri, PH; Ferreira, AG. **Perfil químico de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) pela técnica De High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS).** *Quim. Nova,* 2010, 33 (3): 634-638.

9 Boniglia, C; Carratù, B; Stefano, S; di; Giammarioli, S; Mosca, M; Sanzini, E. **Lectins, trypsin and α -amylase inhibitors in dietary supplements containing *Phaseolus vulgaris*.** *European Food Research and Technology*. 2008; 227 (3): 689-693.

10 Foglio, MA; Queiroga, CL; Sousa, IMO; Rodrigues, RAF. **Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar construindo a história dos produtos naturais.** *MultiCiência*. 2006, 7 (6): 1-8.

11 Viegas Júnior, C; Bolzani, VS; Barreiro, EJ. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** *Quim. Nova*. 2006; 29 (2): 326-337.

12 Kwon, YI; Apostolidis, E; Shetty, K. **Inhibitory potential of wine and tea against α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes.** *J. Food Biochem*. 2006; 32 (1): 15-31.

13 Noelting, G; Bernfeld, P. **Sur les enzymes amylolytiques III. La amylase: dosage d'activate et controle de l' α -amilase.** *Helv. Chim. Acta*. 1948; 31 (1): 286-290.

14 Souza, SP. **Ação inibitória de extratos de plantas sobre lipase pancreática com ênfase em *Baccharis trimera* (Less.) DC.** 2009. 84 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

15 The United States Pharmacopeia. **The national formulary NF 18 (Pharmacopeial Convention Ing)**. Rockvile, 1995.

16 Venkateswaran, S; Pari, L. **Effect of *Coccinia indica* leaves on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rats.** *J. Ethnopharmacol.*, 84: 163-168, 2003.

17 Pari, L; Venkateswaran, S. **Protective role of *Phaseolus vulgaris* on changes in the fatty acid composition in experimental diabetes** *J Medic. Food*. 2004, 7 (2): 204-209.

18 Lee, JS. **Effects of soy protein and genisteína on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Life Sciences*. 2006, 79 (16): 1578-1584.

19 Prolla, IRD. **Características físico-químicas de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e efeitos biológicos da fração fibra solúvel.** 2006. 84 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

20 Gaamoussi, F.; Israili, Z.; Lyoussi, B. **Hypoglycemic and hypolipidemic effects of an aqueous extract of *chamaerops humilis* leaves in obese, hyperglycemic and hyperlipidemic meriones shawi rats.** *Pak. J. Pharm. Sci.* 2010, 23 (2): 212-219.

21 Silva, HH; Terra, WR; Grossi-de Sá, MF; Samuels, RI; Isejima, EM; Bifano, TD; Almeida, JS. **Induction of digestive α -amilase in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α -amilase inhibitor 1.** *J. Insect Physiol.* 2001, 47: 1283-290.

22 Antunes, AF. **Atividade inibitória de extratos vegetais do cerrado sobre a α -amilase.** 2008. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasil.

23 Whitcomb, DC; Lowe, ME. **Human pancreatic digestive enzymes.** *Dig Dis Sci.* 2007, 52: 1-17.

24 Pequeno, NF; Soto-branco, B. **Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica.** *Acta Scientiae Veterinariae.* 2006, 34 (1): 45-48.

25 Gandhi, VM. & Cherian, KM. **Red cell haemolysis test as an in vitro approach for the assessment of toxicity of karanja oil.** *Toxicology in Vitro*. 2000, 14: 513-516.

26 Mulky, MJ. & Gandhi, VM. **Mowrah (*Madhuca latifolia*) seed saponin. Toxicological studies.** *J. Appl. Chem. Biotechnol.*. 1977, 27: 708-713.

27 Cardéas, LLAR; Leonel, AJ; Costa, NMB. **Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2008, 28 (1): 200-213.

28 Aparicio, RM; García-Celma, MJ; Vinardell, MP; Mitjans, M. **In vitro studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes.** *J. Pharm.Biom. Anals.* 2005, 39: 1063-1067.

29 Bukowska, B; Kowalska, S. **Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes.** *Toxicology Letters*. 2004, 152: 73-84.

APLICAÇÃO DO TESTE DO COMETA PARA AVALIAR OS EFEITOS DA FARINHA DE FEIJÃO BRANCO SOBRE O DNA DE LINFÓCITOS HUMANOS

Luciana Lopes Silva Pereira, Custódio Donizete Dos Santos, Lívia Cabral Sátiro, Silvana Marcussi, Larissa Fonseca Andrade, Lisete Chamma Davide.

1 RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial de indução de efeitos genotóxicos de farinha de feijão branco utilizando o teste do Cometa. O teste foi realizado com linfócitos humanos presentes em sangue total, imediatamente após a coleta, através de incubação com solução de farinha de feijão branco em três concentrações (3,92, 9,52 e 18,18 $\mu\text{g/mL}$), a 37°C por 4 h, seguida por preparação das lâminas e avaliação da integridade dos nucleóides. Amostras foram consideradas positivas (danos acima de 20%) quando os danos observados no DNA celular foram maiores que no controle negativo. Constatou-se que as doses testadas não apresentaram potencial genotóxico. Ainda assim, seria prematuro fazer recomendações sobre a ausência de riscos à saúde humana resultantes de danos no DNA uma vez que a exposição das células ao extrato restringiu-se à 4 horas e não durante um ciclo celular completo. Adicionalmente, outras informações sobre a toxicologia deverão ser futuramente obtidas por testes de mutagenicidade.

Palavras-chaves: Genotoxicidade, farinha de feijão branco, teste do Cometa.

2 ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the potential induction of genotoxic effects of white bean flour using the Comet assay. The test was conducted with human lymphocytes present in whole blood immediately after collection, by incubation with a solution of whitebean flour in three concentrations (3.92, 9.52 and 18.18 mg / mL) at 37°C for 4 h followed by preparation of the slides and assessing the integrity of the nucleoid. Samples were considered positive (above 20% damage) when the observed damage in cellular DNA were higher than negative control. It was found that the doses tested showed no genotoxic potential. Yet it would be premature to make recommendations about the absence of risks to human health resulting from DNA damage since the exposure of cells to the extract was restricted to four hours rather than during a whole cell cycle. Additionally, other information on the toxicology should be further obtained by mutagenicity tests.

Keywords: Genotoxicity, white bean flour, comet assay.

3 INTRODUÇÃO

A necessidade de novos fármacos tem estimulado a pesquisa de moléculas que atuem como inibidores enzimáticos e a triagem de substratos e/ou inibidores que se liguem seletivamente às enzimas. Os inibidores protéicos de α -amilase (1-4 α D-glucan-glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) são amplamente distribuídos em plantas, principalmente em cereais (trigo e cevada) e feijão. Esta inibição induz tolerância aos carboidratos, saciedade, perda de peso e prolongamento do tempo de esvaziamento gástrico; que podem ser úteis no tratamento da obesidade e diabetes mellitus não insulino-dependente (CHEN et al., 2008). O uso cotidiano da farinha de feijão branco tem se tornado cada vez mais frequente, dada a presença do inibidor de α -amilase conhecido como faseolamina. No entanto, estudos revelam a presença de fatores antinutricionais importantes no feijão cru (PEREIRA et al., 2009). Portanto, ainda há dúvidas quanto a viabilidade do uso da farinha de feijão cru considerando os benefícios e prejuízos à saúde.

Organismos vivos apresentam um genoma que está sob constante ação de agentes exógenos ou endógenos que podem afetar a integridade química do DNA alterando as informações nele contidas. Diferentes alterações são responsáveis pela instabilidade genômica, tendo importante papel na carcinogênese (JEFFORD; IRMINGER-FINGER, 2006). Assim, mutações podem se originar em genes que controlam a síntese e reparo de DNA, o ciclo celular ou a apoptose, levando a um aumento da taxa de mutação basal, o que esclarece satisfatoriamente o fato de haver múltiplas mutações em tumores (SARASIN, 2003).

Aberrações cromossômicas, trocas entre cromátides irmãs e formação de micronúcleos em linfócitos do sangue periférico humano têm sido considerados como alterações biomarcadoras de exposição a agentes genotóxicos e

carcinogênicos. Alguns pesquisadores assumem que os mecanismos de formação de danos no DNA são similares nos diferentes tecidos, e desta forma, sugere-se que os níveis de danos nos linfócitos possam refletir os que ocorreriam nos demais tecidos (ALBERTINI et al., 2000; NORPPA, 1997).

Para que um produto seja recomendável como alimento e/ou medicamento, suas propriedades biológicas devem ser bem conhecidas. Entre os testes recomendados pela Food and Drug Administration (FDA), destacam-se os relacionados às atividades mutagênicas e antimutagênicas (FDA, 2001).

A Toxicologia Genética é uma área que aborda principalmente os estudos de mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade. Nesta área existem vários ensaios para biomonitoramento da mutagênese e genotoxicidade e um dos testes utilizados para avaliação do potencial mutagênico é o Cometa, que é um ensaio simples, rápido, sensível e de baixo custo quando comparado a outros testes para detecção de danos no DNA (TICE et al., 2000). O Ensaio do Cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo ensaio do Cometa são passíveis de correção. Assim, o ensaio pode ser também utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo (ALBERTINI et al., 2000). A técnica consiste na imersão de células viáveis em gel de agarose, lise da membrana celular por detergentes e sais alcalinos, e posterior eletroforese. Sob condições alcalinas de eletroforese, os DNAs celulares que sofreram danos apresentam maior taxa de migração em direção ao ânodo, devido a quebras de fita simples ou duplas e sítios lábeis alcalinos simulando a aparência de um cometa (cabeça e cauda) (PAVÃO et al., 2007).

No caso da farinha de feijão branco, a utilização do teste do Cometa permitirá avaliar se a dose recomendada para o consumo humano seria passível

de induzir danos ao DNA após breve tempo de exposição das células sanguíneas.

Além disso, não há dados na literatura relacionados à pesquisa de mutagenicidade da farinha de feijão branco. Neste contexto, objetivou-se verificar a possível indução de danos no DNA de células humanas pelo teste do Cometa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo da farinha de feijão branco (FFB)

O feijão branco foi cultivado em Campo Belo, MG, e adquirido em supermercado local. Os grãos com casca foram lavados em água destilada e secos em estufa com circulação de ar, a 30°C até peso constante. Para obtenção da farinha (FFB), os grãos foram triturados em moinho manual e em seguida em um moinho de facas (TE 631 Tecnal) para obtenção de uma menor granulometria.

O preparo do homogeneizado de FFB, em concentração de 0,2g/mL, foi realizado em câmara de fluxo laminar utilizando tampão PBS estéril.

4.2 Preparo dos tratamentos

Foi utilizado sangue periférico de 5 voluntários com idade entre 21 e 40 anos, sem manifestação de sinais ou sintomas de doença, após consentimento livre e esclarecido. Indivíduos tabagistas ou ocupacionalmente expostos a contaminantes ambientais (agrotóxicos, tintas, etc) e aqueles que utilizam medicamentos de uso contínuo foram excluídos da amostra. O sangue foi coletado a vácuo e protegido da luz imediatamente após a coleta. A seguir, diferentes volumes do homogeneizado de FFB foram adicionados a alíquotas de 500 µL de sangue para obtenção de amostras com concentrações crescentes da FFB (3,92; 9,52 e 18,18 µg/mL sangue). Além das amostras, foram preparados os controles negativo (500 µL de sangue) e positivo (doxorrubicina 18,0 µg/mL de sangue). A doxorrubicina é um antitumoral da família das antraciclina, capaz de causar dano ao DNA e, portanto, amplamente empregada como controle no teste do cometa uma vez que sabidamente induz danos de nível 3 e 4 em DNA de células animais (BARCELOS et al., 2009).

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar e ao abrigo da luz.

Finalmente, as misturas de sangue com os diferentes tratamentos foram incubadas por 4 horas em estufa a 37°C. Logo em seguida procedeu-se ao ensaio do Cometa.

4.3 Teste do Cometa

O teste do cometa foi realizado de acordo com a metodologia descrita por TICE et al. (2000), com modificações. As lâminas foram previamente cobertas por solução de agarose de ponto de fusão normal (NMP) a 1%. Esta camada foi utilizada para promover a adesão da agarose de baixo ponto de fusão (LMP) contendo as células. Para tanto, uma alíquota (5µL) de cada suspensão celular contendo os tratamentos foi misturada a 100 µL de agarose LMP e gotejada sobre a lâmina, coberta com a lamínula (24x60mm) e mantida em baixa temperatura ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) por 5min, até solidificação do gel. A seguir, a lamínula foi retirada e as lâminas mergulhadas em solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO; pH 10), protegidas da luz, onde permaneceram por 24 h à 4°C. Após esse período, as lâminas foram transferidas para uma cuba contendo solução de eletroforese (1 mM EDTA, 300mM NaOH; pH 13), deixadas em geladeira por 20 minutos e a seguir colocadas na posição horizontal na cuba de eletroforese. A cuba foi preenchida com a solução de eletroforese recém-preparada, a um nível superior (0,25cm, em média) às lâminas. Estas ficaram em repouso por 20min para permitir o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios alcali-lábeis. A eletroforese foi conduzida a 4°C com 25V e 300mA, por 30min. Em seguida, as lâminas foram retiradas da cuba, mergulhadas na solução tampão de neutralização (0,4M tris; pH 7,5) por 15min e colocadas em grade até

a secagem completa, quando foram fixadas com etanol 100% por 3 minutos. Posteriormente, foram coradas com iodeto de propídio na concentração final de 2,5 µg/mL utilizando um volume de 50µL, cobertas com lamínula e visualizadas ao microscópio de fluorescência Nikon ECLIPSE E400, em aumento de 400 X. Foram analisados 100 nucleóides por lâmina, 4 lâminas por indivíduo, totalizando 2000 células por tratamento.

4.4 Análise estatística

O dano no DNA foi avaliado analisando-se cada nucleóide de acordo com as cinco classes pré determinadas, que inicia em 0, quando não há formação de cauda por não haver migração do material genético e vai até 4, considerado o dano máximo por apresentar maior cauda e menor concentração de DNA na cabeça. Os cometas foram classificados conforme a extensão do dano no DNA em cinco categorias: sem danos (Classe 0: dano<5%), baixo nível de dano (Classe 1: 5-20%), médio nível de dano (Classe 2: 20-40%), alto nível de dano (Classe 3: 40-85%) e totalmente danificado (Classe 4: dano>85%). Os níveis de danos verificados para cada tratamento foram agrupados em porcentagens. A frequência de danos (FD) foi calculada baseando-se no número de células com cometa, considerando apenas danos acima de 20%. Os resultados foram avaliados estatisticamente mediante a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Scot Knott ao nível de 5% de significância com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de quebras de DNA induzidas pela farinha de feijão branco (FFB) nas doses de 3,92, 9,52 e 18,18 $\mu\text{g/mL}$ foi estatisticamente igual ao controle negativo (Tabela 1) em todas as classes, revelando ausência de genotoxicidade nas concentrações utilizadas, considerando as 4 horas de exposição das células aos tratamentos (Tabela 1). Houve uma predominância de células sem dano (classe 0) e com dano mínimo (classe 1) em todas as concentrações testadas (Tabela 1).

Ensaio semelhante usando o teste do Cometa têm sido realizados por vários autores utilizando extratos de diversas plantas. Um desses estudos foi realizado com extratos de *Miconia*, um gênero de planta popularmente utilizada como analgésico e antineoplásico, e que também resultou em predominância de classe 1 no ensaio do cometa (SERPELONI et al., 2008).

WAN-IBRAHIM et al. (2010) estudaram os efeitos de 20 extratos aquosos de plantas e observaram que apenas dois causaram danos maiores que 50% ao DNA, indicando dano severo. As plantas foram a *V. pinnata*, utilizada no sudeste da Ásia para tratamento de hipertensão arterial de forma popular e a *Q. infectoria* utilizada por possuir atividade anti-radicaís livres, dado o alto teor de compostos fenólicos, dentre eles taninos e ácido gálico. Os autores reportaram que o ácido tânico, por ser um tipo de polifenol solúvel na água, pode causar dano ao DNA na presença de Cu(II). Em contrapartida, há relatos de que o ácido tânico pode induzir resistência ao DNA frente a danos induzidos por alimentos mutagênicos e H_2O_2 . Diante deste paradoxo, uma análise crítica da citotoxicidade dos metabolitos de produtos naturais deve ser feita cuidadosamente, levando-se em consideração os possíveis efeitos adversos e/ou terapêuticos que os extratos podem causar e relacioná-los com a dose e o uso crônico.

Outros produtos naturais como guaco (*Mikania glomerata* Spreng), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss), açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. et. Zucc) e sálvia (*Lippia alba* Mill. NE) apresentam atividade citotóxica e genotóxica induzidas por constituintes como cumarinas, taninos e terpenos presentes em grande quantidade (STANGE et al., 2009).

Os compostos polifenólicos em feijões são primariamente localizados na cobertura da semente e em quantidades baixas ou insignificantes nos cotilédones. As diferenças de coloração entre feijões parecem influenciar a concentração de taninos nos grãos. Alguns autores obtiveram maiores teores de taninos em leguminosas de cores diferentes comparadas com os grãos de cor branca (SILVA e SILVA, 1999). O feijão branco apresenta um teor de tanino de aproximadamente 33,38 mg/100g feijão, enquanto que em outras cultivares, como o feijão preto (diamante negro) e o carioca (pérola), os teores de tanino são de 61,01 e 102,45 mg/100g feijão, respectivamente (CÁRDENAS et al., 2008). Essa menor concentração de tanino no feijão branco, - apesar da presença de outros compostos fenólicos, entre eles, os terpenos (saponinas), além de lectinas (fitohemaglutininas) – poderia explicar os resultados obtidos neste trabalho, isto é, a ausência de efeito tóxico quando avaliado através do teste do Cometa (Figura 1), nas condições em que os experimentos foram realizados.

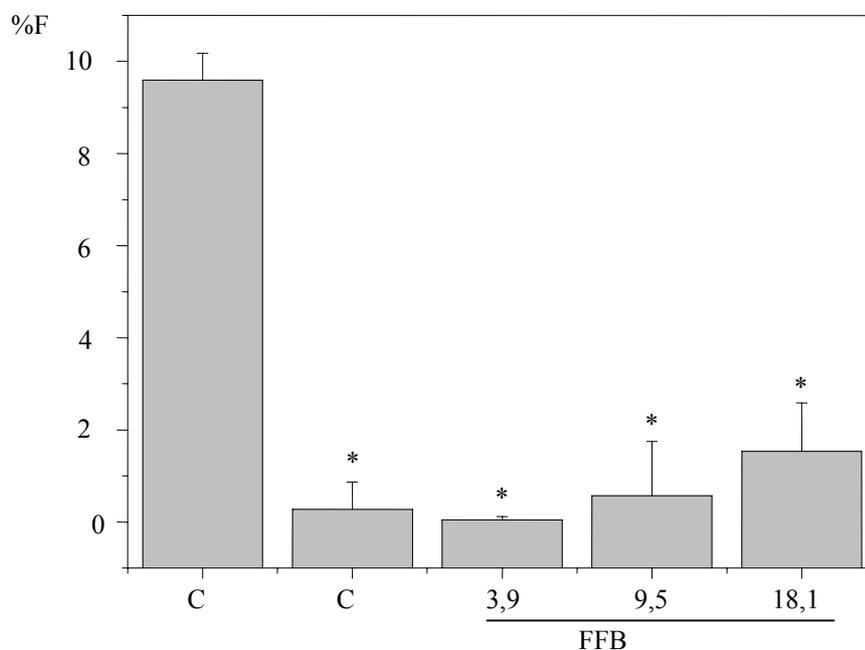


FIGURA 1. Frequência de dano (FD) no DNA de linfócitos humanos tratados com diferentes concentrações de FFB. Resultados expressos em porcentagem de FD nos nucleóides com cometa considerando apenas danos acima de 20% (dano \geq classe 2). Sendo CP: Controle positivo = doxorrubicina (DXR) 18,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e CN: Controle negativo = somente o sangue sem qualquer adição (os valores expressam a média de 5 repetições \pm DP). Diferença significativa em relação ao controle positivo (* $p < 0,01$).

Observa-se um aumento crescente na frequência de dano acima de 20% (dano \geq nível 2) proporcional ao aumento da concentração de FFB. Porém, conforme mostrado na Tabela 1, este aumento é verificado principalmente nas classes 1 e 2 e não há aumento significativo de dano nas classes 3 e 4, como ocorre com o controle positivo. Resultados semelhantes foram obtidos por SANTOS et al. (2008), que ao avaliarem o efeito genotóxico de extratos aquosos de *Physalis angulata* L. (Solanaceae), relataram uma elevação na frequência de cometas com o aumento das doses de extrato, sendo que as classes 1 e 2 foram as mais observadas. As classes estão demonstradas na Figura 2.

Tabela 1. Média do número de células por classe de cometa após tratamento com diferentes concentrações de solução aquosa de FFB.

% Dano	Controle		FFB	FFB	FFB
	(-)	(+)*	(3.92 µg/mL)	(9.52 µg/mL)	(18.18 µg/mL)
Classe 0**	66,08 a	0,25 b	76,13 a	46,29 a	49,52 a
Classe 1**	31,20 c	3,83 d	23,42 c	48,03 c	36,37 c
Classe 2**	2,72 e	38,23 f	0,45 e	5,68 e	10,43 e
Classe 3**	0,00 g	42,82 h	0,00 g	0,00 g	3,68 g
Classe 4**	0,00 i	14,87 j	0,00 i	0,00 i	0,00 i

Os resultados acima representam as médias dos valores obtidos em 3 ou 4 lâminas. 100 nucleóides foram analisados em cada lâmina, sendo 3-4 lâminas/tratamento/voluntário. Foram utilizados 5 voluntários (1 voluntário/experimento).

* Controle positivo = doxorrubicina (DXR) 18,0 µg/mL.

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

Portanto, os resultados deste trabalho, obtidos a partir do teste do cometa sugerem que a farinha de feijão branco encontra-se no perfil de substâncias que não causam efeitos genotóxicos e conseqüentemente mutagênicos ao DNA. Ainda assim, esses resultados não embasam a segurança do consumo terapêutico, sendo necessário o cumprimento de todas as etapas de avaliação pré-clínicas e clínicas, por diferentes experimentos crônicos e testes *in vivo* com concentrações variadas.

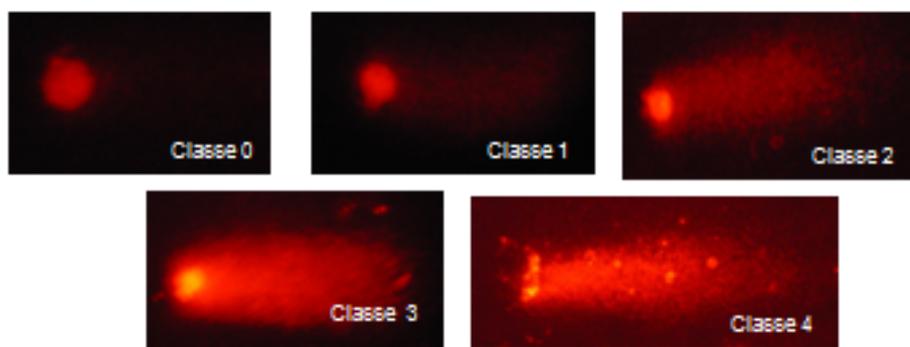


FIGURA 2 Fotomicrografias de nucleóides de linfócitos humanos corados com iodeto de propídio. Aumento de 200x.

A toxicidade de substâncias ou extratos derivados de plantas representa um dos principais problemas na validação de fitoterápicos, sendo necessária sua avaliação em experimentos pré-clínicos. A diversidade de compostos químicos presentes nos produtos naturais implica numa pesquisa minuciosa de possíveis ações biológicas benéficas e/ou deletérias.

Ensaio adicional analisando o uso crônico da farinha de feijão branco são uma perspectiva interessante para se avaliar a possível ocorrência de dano cumulativo, já que é plausível sugerir que eventuais danos podem não ser reparados e trazer algum prejuízo às células e ao indivíduo.

6 CONCLUSÃO

As doses de FFB testadas não foram genotóxicas considerando as 4 horas em que as células foram submetidas a presença dos tratamentos, todavia é prematura a recomendação quanto a eventuais riscos ou benefícios para a saúde humana, pois estudos adicionais de toxicidade, eficácia e segurança são necessários.

7 REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI K, K.; MERLO, F. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 463, n. 2, p.111-172, Aug. 2000.

BARCELOS, G. R.; ANGELI, J. P.; SERPELONI, J. M.; ROCHA, B. A.; MANTOVANI, M. S.; ANTUNES, L. M. Effect of annato on micronuclei induction by direct and indirect mutagens in HepG2 cells. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v.50, n.9, p. 808-814, 2009.

CÁRDENAS, L. R.; LEONEL, A. J.; COSTA, N. M. B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de cultivares de feijão comum. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 200-213, jan./mar. 2008.

CHEN, X.; XU, G.; LI, X.; LI, Z.; YING, H. Purification of an α -amylase inhibitor in a polyethylene glycol/fructose-1,6-bisphosphate trisodium salt aqueous two-phase system. **Process Biochemistry**, London, v. 43, n. 7, p. 765-768, July 2008.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, U. S. Public Health Service, Department of health and human services, Public Health Service Food and Drug Administration College Park, MD 20740, 2001. Disponível em <<http://www.fda.gov/>>. Acesso em: 19 ago. 2010.

JEFFORD, C. E.; IRMINGER-FINGER, I. Mechanisms of chromosome instability in cancers. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Genolier, v.59, n.1, p.1-14, Apr. 2006.

NORPPA, H. Cytogenetic markers of susceptibility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. **Environmental Health Perspectives**, Baltimore, v. 105, n.8, p. 829-835, Aug. 1997.

PAVÃO, P. R. G.; GONTIJO, A. M. M. C.; RIBEIRO, D. A.; SALVADORI, D. M. F. Ausência de efeito genotóxico induzido por esteróides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, São Paulo, v. 21, n.1, p. 5-10, jan./mar. 2007.

PEREIRA, L. L. S.; SANTOS, C. D.; CORRÊA, A. D.; SOUSA, R. V. Estudo comparativo entre inibidor de α -amilase (Faseolamina) comercial e farinha de feijões branco, preto e carioca. **Infarma**, Brasília, v. 21, n. 11/12, p. 11-14, Nov. 2009.

SANTOS, R. A.; CABRAL, T. R.; CABRAL, I. R.; ANTUNES, L. M.; ANDRADE, C. P.; CARDOSO, P. C. S.; BAHIA, M. O.; PESSOA, C.; NASCIMENTO, J. L. M.; BURBANO, R. R.; TAKAHASHI, C. S. Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated *in vitro*. **Biocell**, Mendoza, v. 32, n. 2, p. 195-200, Aug. 2008.

SARASIN, A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 544, n.2-3, p.99-106, Jun. 2003.

SERPELONI, J. M.; REIS, M.B.; RODRIGUES, J.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.; DOKKEDAL, A. L.; CÓLUS, I. M. S. *In vivo* assessment of DNA damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 501–507, Sep. 2008.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n.1, p. 5-19, jan./abr. 1999.

STANGE, V. S.; GOMES, T. D. U. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. C. P. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios *in vivo* e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), Cecropiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n.2B, p. 637-642, Abr./Jun. 2009.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; IYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Bethesda, v. 35, n.3, p. 206-21, 2000.

WAN-IBRAHIM, W.I.; SIDIK, K.; KUPPUSAMY, U.R. A high antioxidant level in edible plants is associated with genotoxic properties. **Food Chemistry**, Reading, v. 122, n.4, p.1139–1144, Oct. 2010.

**INVESTIGAÇÃO TERAPÊUTICA E TOXICOLÓGICA DA
ADMINISTRAÇÃO DE FARINHA DE FEIJÃO BRANCO EM RATOS
WISTAR.**

Luciana Lopes Silva Pereira, Raimundo Vicente de Sousa, Custódio Donizete dos Santos, Chrystian Araujo Pereira, Clarissa Ferreria de Moraes, Livia Cabral Sátiro.

1 RESUMO

No presente estudo, objetivou-se avaliar os possíveis efeitos terapêuticos e tóxicos decorrentes da administração de farinha de feijão branco em ratos Wistar por 21 dias. O ensaio biológico foi realizado para avaliação das consequências do uso da farinha de feijão branco (FFB) cru, na concentração correspondente à dose diária recomendada para exercer efeito hipoglicemiante e emagrecedor, que é de 1.000mg de faseolamina/dia. A administração da FFB na dose de 1mg de FFB/g de peso corporal em ratos Wistar com diabetes induzida por estreptozotocina (STZ), durante um período de 21 dias, não provocou alteração nos parâmetros fisiológicos (consumo de água, de ração e volume de urina), nos indicadores bioquímicos (colesterol total, frações e triglicérides), nas enzimas hepáticas (Gama-GT, AST e ALT), e no peso dos órgãos (pâncreas e fígado), assim como na excreção fecal de proteínas e lipídeos. Por outro lado, uma aumentada excreção de carboidratos nas fezes e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) diminuído confirmam os resultados de inibição da α -amilase. Apesar da tendência à diminuição da glicemia a partir de 20 dias de tratamento, não houve diminuição significativa durante o período avaliado no grupo tratado e a hipoamilasemia observada sugere que altas doses de FFB podem apresentar efeitos deletérios ao organismo decorrentes do uso crônico.

Palavras-chave: diabetes, faseolamina, inibição enzimática

2 ABSTRACT

The objective was to evaluate the possible therapeutic and toxic effects resulting from administration of bean flour in white Wistar rats for 21 days. The assay was performed to assess the consequences of using white bean flour (FFB) crude, at a concentration that contains the dose for the recommended daily to cause weight loss and hypoglycemic effect, which is 1,000 mg of phaseolamine / day. The administration of FFB at 1 mg of FFB / g body weight in wistar rats with diabetes induced by STZ in a period of 21 days, did not alter physiological parameters (consumption of food and water, urine volume) in biochemical markers (total cholesterol, fractions and triglycerides), liver enzymes (gamma-GT, AST and ALT), and weight of organs (liver and pancreas) as well as in fecal excretion of proteins and lipids. An increased excretion of carbohydrate fecal confirms the results of inhibition of α -amylase. Serum levels of amylase were shown to be able to contribute to the diagnosis of pancreatic injury, but did not correlate with the severity of injuries. Thus, the decline of serum amylase suggests the occurrence of cell damage in the pancreas, confirmed by histological analysis. Despite the tendency to decrease blood glucose from 20 days of treatment, no significant reduction during the period evaluated in the treated group. It can be concluded that despite the decreasing tendency of hyperglycemia and can aid in weight loss by decreasing absorption of carbohydrates in the diet, high doses of HBB may have deleterious effects on the body resulting from chronic use.

Keywords: diabetes, phaseolamine, enzymatic inhibition

3 INTRODUÇÃO

O termo "low-carb" tornou-se parte do vocabulário atual, e o número de alimentos com reduzido teor de carboidratos e suplementos alimentares com bloqueadores de amido destinados à perda de peso aumentou drasticamente nos últimos anos. Bloqueadores de amido são utilizados com o intuito de promover a perda de peso e a diminuição da glicemia, interferindo na digestão de carboidratos através da inibição da α -amilase, enzima digestiva responsável pela quebra de carboidratos complexos (como o amido) em açúcares simples, que podem então ser absorvidos no intestino delgado. O resultado final é uma redução potencial em calorias, disponibilidade de carboidratos e derivados (Chokshi, 2006).

O feijão branco tem sido considerado a melhor fonte de um inibidor de α -amilase, também conhecido como faseolamina. Extratos de feijão (*Phaseolus vulgaris*), bem como alguns de seus componentes isolados, têm sido reportados pelos efeitos na redução do apetite e no peso corporal e diminuição da glicemia em ratos (Fantini et al., 2009). Estudos relatam que a administração diária repetida de extrato de feijão branco cru reduziu marcadamente a ingestão diária de alimentos em ratos com acesso a uma dieta enriquecida com amido; efeito este, associado com uma redução no ganho de peso corporal, bem como uma redução constante da glicemia (Tormo et al., 2007, Fantini et al., 2009).

As propriedades do feijão branco o colocaram na lista dos mais procurados por aqueles que querem perder peso, que enfrentam uma dieta restritiva ou que possuem hiperglicemia. No entanto, além de inibidores de α -amilase, o feijão cru possui uma variedade de fatores antinutricionais e de substâncias potencialmente tóxicas que podem ocasionar uma redução na eficiência alimentar e alterações histopatológicas (Chokshi, 2006).

Neste contexto, objetivou-se avaliar os possíveis efeitos terapêuticos e tóxicos decorrentes da administração de farinha de feijão branco em ratos Wistar com diabetes induzido por estreptozotocina. O ensaio biológico foi realizado para avaliação das consequências do uso da farinha de feijão branco (FFB) cru, na concentração correspondente à dose diária recomendada para exercer efeito hipoglicemiante e emagrecedor.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A avaliação da eficácia e da toxicidade da farinha de feijão branco (FFB) foi realizada por meio de ensaios biológicos com ratos, conduzidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

4.1 Material

4.1.1 Equipamentos

As análises bioquímicas foram realizadas com o equipamento Analisador Bioquímico Veterinário Automático Thermoplate. A glicemia semanal foi determinada utilizando tiras reativas e o monitor Accu-Chek Active.

Reagentes

Para as análises de glicose, amilase, colesterol total, colesterol HDL, triglicérides, AST, ALT e Gama-GT foram utilizados kits comerciais Labtest[®] (Brasil).

4.1.2. Obtenção da farinha de feijão branco (FFB)

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. A farinha obtida foi acondicionada em frasco hermeticamente fechado, ao abrigo da luz, até o momento da utilização.

4.1.3 Animais

Os animais utilizados foram ratos albinos da linhagem Wistar, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A temperatura do biotério foi mantida a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, com alternância automática de claro-escuro em períodos de 12 horas. Os animais receberam dieta (ração própria para a espécie, Nuvilab CR1[®]) e água *ad libitum*. O ensaio teve duração de 21 dias, contados a partir da confirmação da indução de diabetes. Durante todo o experimento os animais ficaram em gaiolas metabólicas individuais. Os cuidados de higienização e alimentação foram diários e realizados por tratador único. O projeto foi submetido à avaliação prévia da Comissão de Bioética da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Lavras, sendo, sob o protocolo n° 037/2010.

Estudo de eficácia e toxicidade

Foi realizado ensaio biológico, durante 21 dias, para avaliação da eficácia e toxicidade subcrônica da FFB. No planejamento e execução da pesquisa, foram obedecidas as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e a Resolução RE n°90 da Anvisa, de 16 de março de 2004, que determina a publicação do guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos.

4.2 Procedimentos experimentais:

4.2.1 Indução do diabetes

Foram utilizados 20 ratos divididos em dois grupos - controle e tratado - ambos diabéticos. O diabetes foi induzido com uma solução de estreptozotocina (STZ) Sigma[®] na dose de 60 mg/kg dissolvida em tampão de citrato de sódio

0,01M com pH 4,5 no momento da inoculação intraperitoneal. Após 15 dias, a glicemia foi aferida para que se excluíssem possíveis reversões espontâneas precoces do diabetes mellitus induzido.

4.2.2 Administração do tratamento

Após a indução do diabetes e do período de adaptação, os animais foram pesados e distribuídos em 2 grupos de dez animais cada um, discriminados de acordo com o tratamento a ser administrado por gavagem: Grupo 1 (controle) – água e Grupo 2 (tratado) – FFB. A administração foi realizada diariamente por gavagem, utilizando cânula de aço inoxidável e seringa esterilizados, no mesmo horário, pelo mesmo indivíduo, respeitando-se o volume máximo de 1 mL por animal.

A FFB foi administrada diariamente, no grupo tratado, dissolvida em água, por gavagem na dose que contém a quantidade de proteína inibidora de α -amilase (faseolamina) recomendada para humanos (1g/dia).

Para o cálculo da dose, foi considerado o teor de proteína na FFB de 13% (Pereira et al., 2010). O teor de inibidor de α -amilase (faseolamina) corresponde de 9 a 11% das proteínas da FFB (Obiro et al., 2008). Considerando a recomendação diária de faseolamina, de 1 grama/dia; e o peso corporal médio de um indivíduo humano adulto de 70kg, pode-se calcular a dose por grama de peso corporal; que equivale a 1mg g^{-1} peso corporal do animal. Para tanto, a solução de FFB administrada ao grupo tratado foi preparada diariamente na concentração de $0,2\text{g mL}^{-1}$, e o volume administrado calculado de acordo com o peso de cada rato. Dessa forma, a cada animal foi administrado, por gavagem, um volume de solução da amostra correspondente à dose calculada em função do seu peso corporal aferido no dia. O mesmo procedimento foi realizado para o grupo controle ao qual foi administrada apenas água.

4.2.3 Coleta de dados

Os pesos dos animais, bem como os consumos de ração e água (diferença entre a quantidade oferecida e a quantidade restante depois de 24 horas), foram anotados diariamente para avaliação de parâmetros, como ganho de peso, curva de crescimento e variação do apetite e da sede. Foi aferido também o volume de urina excretado e o peso seco das fezes, que foram coletadas. Nas fezes, foram determinados os teores de umidade, proteína (%N x 6,25), lipídeos, e carboidratos. O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi calculado pela relação direta entre a média de ganho de peso e de consumo de ração pelos grupos.

Semanalmente, no mesmo dia e horário, a glicemia dos animais foi aferida e o sangue coletado por meio da técnica de amputação da cauda.

Ao completar 21 dias de experimento, os animais foram submetidos a jejum nas 12 horas anteriores ao sacrifício, que foi realizado com anestesia prévia com Tiopental 25mg/kg intravenosa (IV), seguida por exsanguinação por punção cardíaca. Após o sacrifício, foi realizada também necropsia com retirada de órgãos internos (coração, fígado, rins, pâncreas e duodeno), preparação de lâminas histológicas e pesagem do fígado e do pâncreas.

4.2.4 Análises laboratoriais do sangue

Utilizando-se o sangue coletado do coração, foram realizadas dosagens laboratoriais para avaliação de parâmetros bioquímicos ou metabólicos (glicose, colesterol total, colesterol HDL, triglicérides e Gama-GT, ALT, AST e amilase). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

4.2.5 Análises laboratoriais das fezes

Do 2º ao 21º dia, as fezes dos grupos controle e tratado foram coletadas. Amostras de cada grupo foram dissolvidas em água, para aferição do pH. O restante das fezes dos dois grupos foi seco em estufa a 50°C até peso constante e posteriormente triturado em um moinho de facas (TE 631 Tecnal) a fim de obter um pó homogêneo, que foi utilizado na determinação dos teores de lipídeos, proteínas e carboidratos. O teor de proteína bruta foi determinado pelo método semi-micro de Kjeldahl, conforme a AOAC (2000), convertendo-se o teor total de N em proteína pelo uso do fator 6,25. O teor de lipídeos foi determinado pela extração com metanol e clorofórmio, de acordo com o método descrito por Folch et al. (1957), e os carboidratos foram determinados pelo método de antrona proposto por Trevelyan & Harrison (1952).

4.2.6 Histopatologia

Para as análises histopatológicas, foram preparadas lâminas histológicas a partir de fragmentos dos órgãos retirados na necropsia. No processamento histológico, os órgãos foram seccionados em pequenos fragmentos, fixados com formalina tamponada nas primeiras 24 horas e, depois, armazenados em álcool 70% para conservação, até o procedimento de inclusão. Posteriormente, os fragmentos foram processados para inclusão em blocos de parafina que, a seguir, foram submetidos à microtomia, resultando em cortes de cerca de 3 µm de espessura. Os cortes obtidos foram, então, corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE) e montados em lâminas/lamínulas de vidro, para avaliação histopatológica com microscópio óptico.

4.3 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 2 tratamentos (controle e tratado) em 10 repetições. Para o tratamento dos dados, foi feita análise de variância e, para a comparação das médias, foi empregado o teste de Scott- Knott, a 5% de probabilidade.

Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o software SISVAR (Ferreira, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Indução de diabetes e efeito hipoglicêmico

A definição operacional utilizada para diagnóstico do estado diabético foi, perda de peso associada a duas glicemias acima de 400 mg/dL (22,1mmol/L), 14 dias após injeção intraperitoneal da STZ (Delfino et al., 2002). Os sinais clínicos mais relevantes observados nestes animais foram, poliúria, perda de peso e alterações na pelagem, comuns em animais com níveis elevados de glicemia (Lerco et al., 2003). Após a indução, os 20 animais foram divididos em 2 grupos que apresentaram boa homogeneidade em relação aos níveis glicêmicos no tempo zero (imediatamente antes do tratamento).

Com relação à gravidade da hiperglicemia observada após a administração intraperitoneal de 60mg/kg de STZ, houve um aumento significativo da glicemia; que variou entre 397 e 487 mg/dL. Valores semelhantes foram obtidos com o mesmo procedimento por outros autores (Delfino et al., 2002; Santos Junior, 2006; Rodrigues et al., 2010).

A glicemia de jejum verificada no último dia do experimento foi de 488 ± 64 mg/dL no grupo controle e 492 ± 19 mg/dL no tratado. Não foi observada uma diminuição da hiperglicemia do grupo tratado. No entanto, vale ressaltar que o efeito hipoglicemiante da faseolamina refere-se à glicemia pós-prandial, já que o inibidor de α -amilase interfere *in loco* na digestão de carboidratos provenientes da dieta, não necessitando de absorção para a corrente sanguínea para exercer sua ação.

A glicemia média dos grupos no início do tratamento e após 7, 14 e 21 dias foi de 424, 450, 464 e 487mg/dL no grupo controle e 397, 447, 460 e 412mg/dL no grupo tratado, respectivamente. Desta forma, após 21 dias houve uma diminuição de 15,4% nos níveis de glicemia no grupo tratado em relação ao

controle. Apesar desta tendência à queda da glicemia a partir de 20 dias de tratamento, não houve diminuição significativa durante o período avaliado no grupo tratado. Um período maior de avaliação seria necessário para a obtenção de dados mais conclusivos.

5.2 Parâmetros fisiológicos

No gráfico da Figura 1 pode-se observar a curva de crescimento dos animais tratados e controle, a cada 3 dias, durante todo o período do experimento.

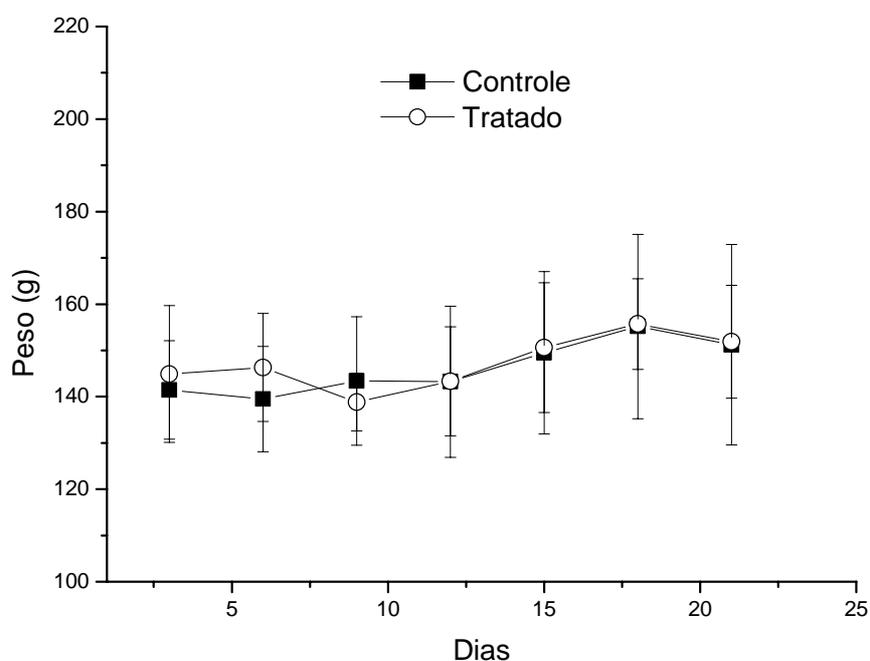


FIGURA 1 Curva de crescimento dos ratos, durante os 21 dias de experimento. Os pontos representam as médias \pm desvio padrão do peso médio do grupo controle e tratado a cada 3 dias de experimento. Não houve diferença significativa entre os grupos em todas as semanas avaliadas.

Verificou-se que os grupos, controle e tratado, não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$). No entanto, dados os altos níveis glicêmicos dos animais, o ganho de peso foi prejudicado; mesmo no grupo controle.

O desempenho dos animais experimentais em relação ao consumo médio de água, de alimento, eficiência alimentar e volume médio diário de urina encontram-se sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 Consumo médio diário de ração, água, volume de urina, e coeficiente de eficiência alimentar durante os 21 dias do experimento, para os grupos controle e tratado.

Parâmetros	Controle	Tratado	CV
Consumo médio de ração (g dia ⁻¹)*	32,10±2,5c	29,10±1,9c	10,11
Consumo médio de água (mL dia ⁻¹)*	93,82±6,8a	100,76±10,6a	9,65
Volume de urina (mL dia ⁻¹)*	76,20±7,5b	72,60±4,9b	8,86
Coeficiente de eficiência alimentar	0,34±0,02 d	0,22± 0,01 e	7,59

*Valores são a média de cada animal por dia, durante os 21 dias de experimento.

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

Em relação ao consumo de dieta; não foi observado, efeito da administração de farinha de feijão branco, já que a ingestão diária de ração pelos grupos controle e tratado foi estatisticamente igual. Adicionalmente, não houve alteração do consumo diário de água e do volume de urina entre os grupos. Fantini et al. (2009), por outro lado, relataram diminuição do peso corporal, da glicemia e da ingestão alimentar em ratos. No entanto, tais resultantes foram decorrentes da administração de 500 mg de extrato seco de *Phaseolus vulgaris* /kg do animal uma vez ao dia por 10 dias, e não da farinha de feijão branco utilizada em nosso estudo.

A Tabela 2 contém resultados das análises de pH, umidade e teores de carboidrato, lipídeo e proteína das fezes durante todo o experimento.

Tabela 2 PH, umidade e proporção (%) de nutrientes excretados nas fezes secas pelos ratos nos grupos controle e tratado.

	Controle	Tratado	CV
Ph	6,93±0,2 a	7,11±0,4 a	4,86
Umidade (%)	62,5±1,9 b	64,4±3,5 b	8,63
Carboidrato (mg.g ⁻¹)	24,26±2,4 c	29,04±2,8 d	15,95
Lipídio (mg.g ⁻¹)	46,04±6,2e	45,21±3,9 e	18,58
Proteína (mg. g ⁻¹)	32,25±1,5 f	33,37±1,4 f	4,33

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

Verifica-se que não houve diferença entre o grupo tratado e o controle, quanto ao pH, umidade e às quantidades totais de lipídio e proteína.

A excreção de carboidrato foi maior no grupo tratado, reforçando as evidências de inibição da α -amilase *in vitro* com diminuição da absorção, e consequente aumento na excreção de carboidratos pelas fezes. A excreção aumentada de carboidratos pode justificar a menor eficiência alimentar do grupo tratado em relação ao controle (tabela 1). Ao longo prazo, esta inibição pode auxiliar na perda de peso pela diminuição da disponibilidade de caloria proveniente dos carboidratos ingeridos e na diminuição da glicemia pós-prandial em indivíduos diabéticos. Deve-se ressaltar que uma ação afetiva requer uma dieta balanceada e a prática de atividades físicas diariamente.

Pesquisas com diversas cultivares demonstraram que o feijão comum varia amplamente quanto à presença de inibidores de tripsina termoestáveis, e que as ligações dissulfeto entre cisteínas contribuem para a estabilização da estrutura terciária da proteína e, portanto, há maior termoestabilidade desses

inibidores (Lujan et al., 2008). Todavia, apesar da elevada inibição da tripsina *in vitro*, o teor de proteína excretado nas fezes não diferiu estatisticamente entre os grupos controle e tratado. Pode-se sugerir que a inibição da tripsina no duodeno possa induzir uma maior produção desta enzima pelo pâncreas, com o objetivo de manter a digestão protéica intacta. Os inibidores de proteases aceleram a secreção de enzimas por um mecanismo de “feedback” por meio da colecistoquinina (CCK). Normalmente, a quantidade de enzimas secretadas pelo pâncreas é regulada pelo teor de proteínas existente no lúmen intestinal. A tripsina se liga a proteínas até que esteja em excesso; quando isso acontece, a tripsina livre envia um sinal ao pâncreas para reduzir a síntese de tripsinogênio. Porém, quando o inibidor se liga à tripsina, a secreção pelo pâncreas do tripsinogênio é maior. Isso resulta em hipertrofia do pâncreas, uma resposta biológica reversível que não ocasiona dano ao órgão ou à sua função (Duarte et al., 2010).

Até recentemente não se sabia como a inativação da tripsina pelo inibidor estimulava a produção de CCK. Já foi isolado do suco pancreático de ratos um “peptídeo monitor”, o qual é sensível à tripsina. Esse peptídeo age como um sinal para liberação do hormônio CCK na mucosa intestinal. A inativação desse peptídeo pela tripsina leva ao bloqueio da liberação do CCK, porém, quando a tripsina está complexada com o inibidor, o peptídeo está livre para induzir a liberação do referido hormônio, cujo efeito é o aumento do pâncreas com a consequente elevação da secreção de enzimas digestivas (Duarte et al., 2010).

5.3 Parâmetros bioquímicos

Na Tabela 3 são apresentados os resultados de alguns indicadores bioquímicos dosados no sangue dos animais em estudo.

Tabela 3 Níveis sanguíneos médios¹ de colesterol total e frações nos grupos controle e tratado.

Indicadores	Controle	Tratado	CV
Colesterol total (mg dL ⁻¹)	66,6±8,7	59,8±10,2	15,39
Triglicérides (mg dL ⁻¹)	48,2±14,2	49,4±13,2	28,42
HDL-C (mg dL ⁻¹)	31,3±6,4	28,1±4,36	19,03
VLDL-C + LDL-C (mg dL ⁻¹)	35,3±7,5	31,7±7,2	17,3

¹ Dados são a média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos.

A dosagem sanguínea de lipídeos e enzimas hepáticas fornece importantes parâmetros na determinação da segurança de ingredientes funcionais ou de produtos finais derivados de plantas submetidos a ensaios de toxicidade (Patel et al., 2008). Os níveis elevados de colesterol total e triglicérides estão diretamente associados ao prognóstico de risco de aterosclerose coronariana, doença cardíaca isquêmica e infarto, enquanto o colesterol HDL tem efeito protetor contra esses distúrbios. Os resultados das dosagens de colesterol total, triglicérides e colesterol HDL foram estatisticamente iguais para os grupos tratados e controle e indicam que a FFB não interferiu no metabolismo lipídico, sugerindo que não houve efeitos relacionados a alterações das taxas de lipídeos sanguíneos, sejam eles benéficos ou deletérios.

No entanto, pode-se observar (Tabela 3), que apesar de não significativa, houve uma diminuição de 10% na concentração sérica de colesterol no grupo tratado. De maneira similar, foi observado que uma dieta a base de feijão Ouro Branco administrada a ratos Wistar adultos por 28 dias, reduziram em 7% o colesterol sérico, diferença essa que também não se apresentou significativa (Lujan et al., 2008). O efeito hipocolesterolemiantes do feijão tem sido relatado e,

embora os mecanismos de ação não sejam ainda completamente entendidos, apontam os possíveis efeitos das fibras solúveis, saponinas, proteínas e taninos (Lujan et al., 2008).

5.4 Marcadores enzimáticos

5.4.1 Enzimas hepáticas

As enzimas hepáticas comumente incluídas nos perfis de triagem bioquímica sérica são alanina-aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transpeptidase (Gama-GT). Os resultados das dosagens das atividades destas enzimas no sangue dos animais após 21 dias de experimento estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Níveis sanguíneos médios¹ de marcadores enzimáticos nos grupos controle e tratado.

Indicadores	Controle	Tratado	CV
Gama-GT (U L ⁻¹)	220,1±13,4a	220,9±13,3a	6,06
Amilase (U L ⁻¹)	503,8±153,4b	295,9±60,8c	32,44
ALT (U L ⁻¹)	176,1±40,5d	158,06±31,5d	24,06
AST (U L ⁻¹)	159,9±31,0e	127,5±25,4e	28,97

¹ Dados são a média ± desvio padrão.

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

A elevação dos níveis sérico das atividades enzimáticas atribuída à disfunção hepática pode ser decorrente da ruptura dos hepatócitos, resultantes de necrose ou das alterações na permeabilidade da membrana celular (Kaneko, 1989). Lesões ou destruição das células hepáticas liberam as transaminases para a circulação (Motta, 2009).

Com base nos dados da Tabela 4, denota-se que os valores de AST, ALT e Gama-GT foram estatisticamente iguais para os dois grupos. Tal constatação sugere que não houve danos às funções hepáticas e pancreáticas de acordo com os parâmetros bioquímicos analisados.

Também em relação à enzima gama-GT, não houve diferenças significativas entre os grupos analisados. A gama-GT tem aplicação principal no estudo de desordens hepato-biliares, apresentando maior especificidade que outras enzimas hepáticas, como a fosfatase alcalina e as transaminases (Motta, 2009). Assim, o resultado de gama-GT sugere positivamente, que a FFB não tem efeito hepatotóxico (Tabela 4). A elevação dos níveis séricos de gama-GT observada nos 2 grupos está relacionada ao diabetes. Estudos comprovam que, por razões não bem estabelecidas, pacientes diabéticos apresentam atividade de gama-GT elevada (Arsa et al., 2009).

5.4.2 Enzima pancreática

A amilase sérica, por sua vez, apresentou variação significativa entre os grupos, sendo mais reduzida no grupo tratado (Tabela 4). A amilase pancreática é uma molécula protéica envolvida na quebra do amido e glicogênio alimentar em maltose, com aplicação clínica no diagnóstico de pancreatite aguda. Considerando-se que o pâncreas é o órgão mais frequentemente afetado pelos fatores antinutricionais presentes na farinha de feijão cru, havia uma expectativa de que eventuais danos ao pâncreas poderiam refletir em elevação da amilase sérica no grupo tratado, o que não ocorreu de fato. No entanto, a correlação entre o dano pancreático e hiperamilasemia deve ser cuidadosamente considerada. Em estudo realizado com indução de pancreatite moderada e grave em ratos Wistar, observou-se que os valores de amilase foram significativamente menores em ratos do grupo com pancreatite, quando comparados com o controle, e

retornaram aos níveis basais em 2 semanas, acompanhando a regeneração pancreática, como evidenciado pelos padrões histológicos neste período de evolução. Desta forma, a significativa redução da síntese de enzimas pancreáticas, pela lesão das células do pâncreas, pode resultar em diminuição dos seus níveis séricos (Ramos et al., 2005).

Estes achados permitem inferir que os níveis plasmáticos de amilase não se correlacionam diretamente com a gravidade da lesão. A correlação inversa entre este parâmetro e a gravidade da lesão pancreática foi descrita e atribuída ao declínio na capacidade de secreção quando o dano celular pancreático é grave. Esta análise é compatível com a observação de que os níveis mais altos de amilase sérica são encontrados nos modelos experimentais de pancreatite caracterizados por edema intersticial e morte mínima de células. O edema pancreático, que não é indicativo de gravidade, demonstrou melhor correlação com a hiperamilasemia, sendo que os índices usuais para o diagnóstico de pancreatite grave, como necrose acinar apresentam correlação inadequada ou mesmo inversa com o nível de amilase sérica (Ramos et al., 2005).

Em estudo avaliando o desempenho e parâmetros séricos de ratos alimentados com dietas contendo soja integral crua, a amilase sérica apresentou variação significativa entre os grupos experimentais, sendo mais reduzida no tratamento com 100% de substituição de proteína da clara do ovo por proteína de soja (Campello et al., 2009). Neste caso, os autores relacionaram a ausência de hiperamilasemia com manutenção da integridade da estrutura pancreática sem desencadeamento de resposta inflamatória. Contrariamente, em nossos estudos, sugerimos que a diminuição significativa do teor de amilase sérica no grupo tratado com FFB, pode estar relacionada a danos à estrutura celular pancreática possivelmente pela hipersecreção de tripsina para compensar a ação inibitória desta enzima. Concordamos que embora se devam considerar as dificuldades em se estimar a percentagem de extensão da necrose tecidual, os baixos níveis de

enzimas pancreáticas séricas sugerem significativa necrose das células acinares (Ramos et al., 2005).

5.5 Peso dos órgãos

Os principais antinutrientes encontrados no feijão prejudicam principalmente as células do pâncreas e do fígado podendo causar hiperplasia e hipertrofia destes órgãos. Assim, o peso destes órgãos em animais tratados em relação aos não-tratados foi utilizado como parâmetro para verificação de alterações anatômicas. Não houve diferença entre os grupos controle e tratado. O peso médio do fígado foi $6,12 \pm 0,5$ e $6,39 \pm 1$ e do pâncreas $0,11 \pm 0,04$ e $0,12 \pm 0,03$, para os grupos controle e tratado, respectivamente.

5.6 Exame histológico

Na Figura 2 são apresentadas imagens microscópicas capturadas dos órgãos submetidos aos processamentos histológicos. Não foram observadas alterações macroscópicas, à dissecação, nos órgãos analisados: rim, intestino, pâncreas, coração e fígado. Os processamentos histológicos ocorreram de forma similar, em todos os grupos. Para cada órgão/animal/grupo, foi realizada uma fotomicrografia de área mais significativa. Não foram observadas lesões ou alterações microscópicas significativas (hematoxilina-eosina, HE) entre os tecidos animais avaliados entre os grupos controle e tratado (Fotomicrografias a e b).

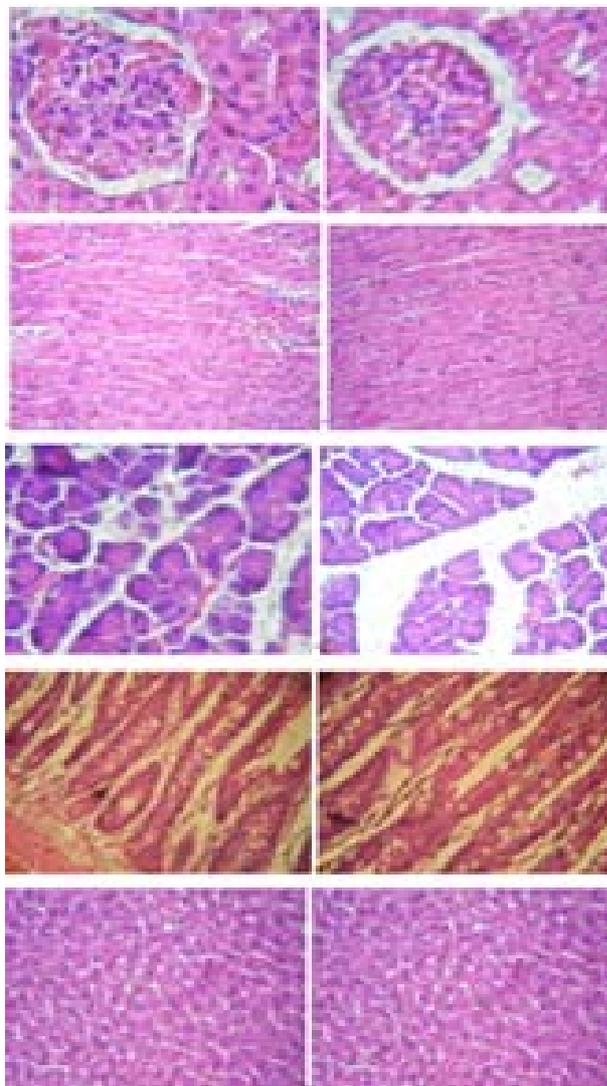


FIGURA 2 Fotomicrografias(esquerda grupo controle e direita grupo tratado) na ordem: rim, coração, pâncreas, intestino delgado e fígado, utilizando coloração HE com aumento de 400x.

A possível alteração pancreática denotada pela hipoamilasemia não foi verificada na histologia. No entanto, o período de tempo do experimento pode não ter sido suficiente para revelar tais danos pela microscopia óptica

6 CONCLUSÕES

A administração de FFB na dose de 1mg de FFB/g de peso corporal em ratos Wistar com diabetes induzido por STZ, por um período de 21 dias resultou numa diminuição da eficiência alimentar e aumento da excreção fecal de carboidratos, o que sugere a inibição da α -amilase *in vivo*. No entanto, não foi observada redução da glicemia no período observado.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 17. ed. Washington, 2000.

ARSA, G.; LIMA, L.; ALMEIDA, S. S.; MOREIRA, S. R.; CAMPBELL, C. S. G.; SIMOES, H. G. Diabetes Mellitus tipo 2: Aspectos fisiológicos, genéticos e formas de exercício físico para seu controle. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, Mogi das Cruzes, v.11, n.1, p.103-111, Jun. 2009.

CAMPELLO, C. C.; CARVALHO, V. L.; VIEIRA, K. M.; FARIAS, D. F.; BRASIL, I. C. F.; MAIA, A. A. B.; MORAES, J. K. S.; CARVALHO, A. F. U.; VASCONCELOS, I. M. Desempenho e parâmetros séricos de ratos alimentados com dietas contendo soja integral crua. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 188-198, 2009.

CHOKSHI, D. Subchronic oral toxicity of a standardized white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) extract in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Kearny, v.45, n.3, p.32–40, June 2007.

DELFINO, V. D. A.; FIGUEIREDO, J. F.; MATSUO, T.; FAVERO, M. E.; MATNI, A. M.; MOCELIN, A. J. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v.24, n.1, p.31-6, Apr. 2002.

DUARTE, M. S. L.; PEREIRA, C. A. S.; SOUZA, E. C. G.; CONCEIÇÃO, L. L. Determinação da atividade *in vitro* de inibidores de tripsina em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) preto, albumina e globulina. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 3, p. 373-376, jul./set. 2010.

FANTINI, N.; CABRAS, C.; LOBINA, C.; GIANCARLO, C.; GESSA, G. L.; RIVA, A.; DONZELLI, F.; MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E.; CARAI, M. A. M. Reducing Effect of a *Phaseolus vulgaris* Dry Extract on Food Intake,

Body Weight, and Glycemia in Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.57, n.19, p.9316–9323, Apr. 2009.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para windows versão 4.0. In: REUNIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, n.1, p. 497-509, May 1957.

KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4.ed. San Diego: Academic, 1989. 932 p.

LERCO, M. M.; SPADELLA, C. D.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI A. S.; PADOVANI, C. R. . Caracterização de um modelo experimental de diabetes mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n.2, p.132-142, Mar. 2003.

LUJÁN, D. L. B.; LEONEL, A. J.; BASSINELLO, P. Z.; COSTA, N. M.B. Variedades de feijão e seus efeitos na qualidade protéica, na glicemia e nos lipídios sanguíneos em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, p.142-149, Dez. 2008.

MOTTA, V. M. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 5. ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2009. 400 p.

OBIRO, W. C.; ZHANG, T.; JIANG, B. The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 100, n. 1, p. 1-12, July 2008.

PATEL, C.; DADHANIYA, P.; HINGORANI, L.; SONI, M. G. Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 8, p. 2728-2735, Aug. 2008.

PEREIRA, L. L. S.; SANTOS, C. D.; PEREIRA, C. A.; MARQUES, T. R.; SÁTIRO, L.C. Precipitação do inibidor de α -amilase de feijão branco: avaliação dos métodos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.21, n.1, p. 15-20, jan./mar. 2010.

RAMOS, J. R. O.; LEITÃO, O. R.; REPKA, J. C. D.; BARROS, S. G. S. Pancreatite aguda experimental induzida pela L-arginina: avaliação histológica e bioquímica. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v.42, n.1, p.55-59, jan-mar. 2005.

RODRIGUES, G.; MARCOLINI, E.; BONA, S.; PORAWSKI, M.; LEHMANN, M. MARRONI, N. P. Hepatic alterations and genotoxic effects of *Croton cajucara* benth (sacaca) in diabetic rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v.47, n.3, jul./set. 2010.

SANTOS JUNIOR, E. R. **O efeito do diabetes induzido pela estreptozotocina em ratas wistar na fase pré-gestacional e gestacional e suas conseqüências no conceito**. 2006, 60p. Dissertação (mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

TORMO, M. A.; GIL-EXOJO, I.; ROMERO DE TEJADA, A.; CAMPILLO, J. E. White bean amylase inhibitor administered orally reduces glycaemia in type 2 diabetic rats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 96, n.3, p.539-544, Abr. 2007.

TREVELYAN, W. E.; HARRISON, T. S. Dosagem de glicídios totais pelo método de antrona. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v.50, p.292, 1952.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A Resumo da análise de variância do consumo médio diário de ração (CMR), água(CMA), volume de urina (VU), e coeficiente de eficiência alimentar (CEA), durante os 21 dias do experimento, para os grupos controle e tratado.	100
TABELA 2A Resumo da análise de variância do pH, umidade e proporção (%) de nutrientes excretados nas fezes secas pelos ratos nos grupos controle e tratado.	100
TABELA 3A Resumo da análise de variância dos níveis sanguíneos médios de colesterol total e frações nos grupos controle e tratado.	100
TABELA 4A Resumo da análise de variância dos níveis sanguíneos médios de marcadores enzimáticos nos grupos controle e tratado.	100

TABELA 1A Resumo da análise de variância do consumo médio diário de ração (CMR), água (CMA), volume de urina (VU), e coeficiente de eficiência alimentar (CEA), durante os 21 dias do experimento, para os grupos controle e tratado.

FV	GL	Quadrado médio			
		CMR	CMA	VU	CEA
Grupo	1	3,3660 ^{NS}	140,3615 ^{NS}	38,0163 ^{NS}	0,0427
Resíduo	10	1,024	89,126	43,846	0,0005
CV (%)		10,11	9,65	8,86	7,59
Média		31,66	97,86	74,74	0,29
geral					

^{NS} Teste F não significativo, a 5% de probabilidade.

TABELA 2A Resumo da análise de variância do pH, umidade e proporção (%) de nutrientes excretados nas fezes secas pelos ratos nos grupos controle e tratado.

FV	GL	Quadrado médio				
		pH	Umidade	Carboidrato	Lipídio	Proteína
Grupo	1	0,1998 ^{NS}	10,8871 ^{NS}	193,4550	4,1666 ^{NS}	3,8081 ^{NS}
Resíduo	10	0,1165	9,9381	18,2658	2,6893	2,0212
CV (%)		4,86	8,63	15,95	18,58	4,33
Média		7,02	36,54	26,79	27,92	32,81
geral						

^{NS} Teste F não significativo, a 5% de probabilidade.

TABELA 3A Resumo da análise de variância dos níveis sanguíneos médios de colesterol total e frações nos grupos controle e tratado.

FV	GL	Quadrado médio			
		Colesterol	Triglicérides	HDL	VLDL + LDL
Grupo	1	136,4466 ^{NS}	4,4229 ^{NS}	29,4521 ^{NS}	20,7628 ^{NS}
Resíduo	10	93,0616	19,1403	32,4515	9,26
CV (%)		15,39	28,42	19,03	17,30
Média geral		62,66	48,68	29,94	33,50

^{NS} Teste F não significativo, a 5% de probabilidade.

TABELA 4A Resumo da análise de variância dos níveis sanguíneos médios de marcadores enzimáticos nos grupos controle e tratado.

FV	GL	Quadrado médio			
		Gama-GT	Amilase	ALT	AST
Grupo	1	1,5604 ^{NS}	126072,29	948.7837 ^{NS}	3063.6362 ^{NS}
Resíduo	10	1,7883	18318,43	164,5653	1798.7007
CV (%)		6,06	32,44	24,06	28,97
Média geral		220,56	417,16	168,58	146.39

^{NS} Teste F não significativo, a 5% de probabilidade.