

Padronização da extração do inibidor proteico de α -amilase de feijão branco

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

*Departamento de Química
Universidade Federal de Lavras, MG
lucianalsp@yahoo.com.br*

Resumo

Os inibidores de alfa-amilase têm sido indicados como auxiliares para produzir perda de peso e controlar o diabetes mellitus tipo 2 pela redução da absorção do amido. Este trabalho padronizou o processo de extração de inibidor alfa-amilase do feijão branco, determinando os parâmetros referentes à 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 alfa-amilase, extração, feijão branco.

Summary

The Alpha-Amylase inhibitors have been indicated as auxiliaries to loss of weight and to the management of diabetes mellitus type 2 through the reduction of starch absorption. This work standardized the process of extraction of white beans alpha-amylase inhibitor determining the extractor, the time of agitation and the conditions for thermal treatment. The results indicate that the methodology used 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 more efficient option in the extraction of inhibitor.

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

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, essa 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.

Nesse 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.

Parte experimental

Materiais e equipamentos

O feijão branco (*Phaseolus vulgaris*) foi cultivado na cidade de Campo Belo, MG, e adquirido em supermercado local com data de validade prevista para novembro de 2012. 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 extratores 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 absorção foram feitas utilizando-se de espectrofotômetro UV/Vis Varian Cary 50.

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.

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 e 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 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.

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.

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

Análise estatística

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

Resultados 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.

Condições de extração

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 sobscritas 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, os quais 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.

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	47,54a
30 minutos	47,15a
60 minutos	46,35a
120 minutos	44,77a
180 minutos	43,18a

* Os valores com as mesmas letras sobscritas 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.

Influência da proporção de extrator

A FFB foi extraída 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.

Influência do tempo de exposição à temperatura de 70°C

O tratamento do extrato a 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 a 70°C para desnaturação de 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 ^a	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 essa 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. Processos iniciais utilizados na purificação do inibidor de α -amilase utilizaram 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 observamos uma perda da atividade inibitória de 25% e 57%, respectivamente, semelhantes aos encontrados por Yamaguchi⁹, que relata

uma perda de 30% para 30 minutos e de 50% para 60 minutos na mesma temperatura.

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 e re-extrações utilizados e a temperatura influenciaram significativamente na eficiência da extração. Os resultados obtidos indicam a metodologia que utiliza 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 na extração do inibidor.

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.

Submetido em 19/02/2010

Aceito em 25/06/2010

