

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE INIBIDOR DE α -AMILASE (FASE OLAMINA) COMERCIAL E FARINHA DE FEIJÕES BRANCO, PRETO E CARIOCA

LUCIANA LOPES SILVA PEREIRA¹
CUSTÓDIO DONIZETE DOS SANTOS²
ANGELITA DUARTE CORRÊA²
RAIMUNDO VICENTE DE SOUSA³

1. Farmacêutica-bioquímica, Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras-UFLA, 37.200-000, Caixa Postal 3037, Lavras, MG.
2. Docentes, Departamento de Química-UFLA.
3. Docente, Departamento de Medicina Veterinária-UFLA

Autor responsável: L.L.S.Pereira. E-mail: lucianalsp@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Os fitoterápicos são amplamente utilizados, porém, por não se tratarem de substâncias purificadas, os efeitos do uso destas formulações são desconhecidos. Grande parte dos medicamentos ditos “naturais”, não possui estudos que justifiquem seu uso. Pesquisas cuidadosas são necessárias para verificação da eficácia e segurança.

O inibidor de α -amilase é vendido em farmácia magistral com o nome de faseolamina, extraída do feijão. Os inibidores da enzima α -amilase com efeitos na inibição da digestão e absorção do amido têm sido utilizados na terapêutica como adjuvantes em dietas para perda de peso e efeito hipoglicemiante em pacientes portadores de diabetes mellitus não-insulino dependentes. No entanto 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 como alimento (Gupta, 1987; Sathe et al., 1984). 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 (Partearroyo et al., 1995).

Na década de 1980, suplementos contendo inibidores de α -amilase foram comercializados como “bloqueadores de amido”, para o controle de obesidade e do diabetes mellitus tipo 2. Entretanto, a maior parte daqueles produtos consistia, principalmente, de simples extratos de feijão com baixa atividade anti-amilásica e alto conteúdo de lectina e inibidores de tripsina, potencialmente danosos. Nos Estados Unidos foram comercializados como “starch

blockers” e proibidos pelo *Food and Drugs Administration* (Liener et al., 1984).

O objetivo neste trabalho foi comparar a Faseolamina, comercializada como fitoterápico em farmácias de manipulação com farinhas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cruas, já que o feijão é utilizado como matéria-prima para obtenção da Faseolamina.

MATERIAL E MÉTODOS

As cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizadas foram Valente (tegumento preto), Pérola (tegumento bege com rajas marrons) e Majestoso (tegumento bege com rajas marrons) fornecidas pelo setor de Genética e Melhoramento de Plantas/Departamento de Biologia da UFLA, MG. O feijão branco foi cultivado em Campo Belo, MG, e adquirido em supermercado local. O produto comercial (faseolamina[®]) foi adquirido em farmácia de manipulação local e obtido de fornecedor de matérias-primas autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Para obtenção das farinhas de feijões, os grãos com casca de cada variedade foram lavados com água destilada, secos em estufa com circulação de ar a 30°C até peso constante, sendo, em seguida, moídos em moinho de facas até obtenção de uma farinha de granulação bem fina, em torno de 60 mesh e acondicionada em frascos hermeticamente fechados, ao abrigo da luz, até as análises. As farinhas de feijões foram preparadas em três repetições.

Composição centesimal das farinhas de feijão e da Faseolamina

Os teores de umidade, proteína bruta (N x 6,25), cinzas e extrato etéreo foram determinados segundo a meto-

dologia descrita pela AOAC (2005). A fibra bruta foi determinada segundo Kamer & Ginkel (1952).

Preparação dos extratos protéicos

As proteínas totais solúveis das farinhas dos feijões e da faseolamina foram extraídas em água na proporção 1:10 m/v. A mistura foi submetida à agitação constante por 1 hora, à temperatura ambiente. Decorrido o tempo, o material foi filtrado em tecido de organza e centrifugado a 10.000xg por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi denominado extrato protéico bruto (EB), que foi utilizado como inibidor das enzimas digestivas. O sedimento foi descartado.

Determinação de proteínas solúveis

A 0,2mL dos EB dos feijões e da faseolamina, foram acrescentados 0,2mL de ácido perclórico 1mol.L⁻¹. Após 10 minutos em gelo, os extratos foram centrifugados a 2300xg por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em NaOH 0,1N e a concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina preparada em NaOH 0,05N como padrão.

Determinação da atividade de tripsina inibida

Para a determinação da atividade de tripsina na presença e ausência dos EB (inibidores), utilizou-se o método proposto por Erlanger et al. (1961), utilizando o N-ben-zoil-D,L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), preparado em tampão TRIS(trihidroximetilaminometano) 0,05 mol.L⁻¹, pH 8,2, como substrato. A atividade de tripsina (tripsina pancreática de suíno Merck – E.C. 3.4.21.4) inibida foi determinada a partir da diferença entre a atividade na ausência (controle sem inibidor) e na presença do inibidor. Simultaneamente foram realizados brancos substituindo o substrato por seu respectivo solvente (branco de enzima), substituindo a enzima por seu respectivo solvente (branco de substrato) e substituindo o substrato e a enzima por seus respectivos solventes (branco amostra). Uma miliunidade (mU) de atividade trípica corresponde à formação de um nanomol de p-nitroanilida por minuto nas condições de ensaio. Os resultados da inibição de tripsina foram expressos em UIT (unidade de inibição de tripsina), que corres-

ponde ao desaparecimento de 1 nanomol de p-nitroanilida (mU) quando comparado com a atividade da tripsina na ausência do inibidor (controle) por miligrama de matéria seca e em atividade específica (UIT mg⁻¹ de proteína).

Determinação da atividade de α -amilase inibida

Para a determinação da atividade de α -amilase na presença e ausência dos EB (inibidores), utilizou-se o método proposto por Noelting & Bernfeld (1948), no qual a solução de amido 1% preparada em tampão TRIS 0,05mol.L⁻¹, pH 7,0 acrescido de NaCl 38mmol.L⁻¹ e CaCl₂ 0,1mmol.L⁻¹ foi utilizada como substrato. A atividade de amilase inibida foi determinada a partir da diferença entre a atividade na ausência (controle sem inibidor) e na presença do inibidor, após pré-incubação por 20 minutos a 37°C. Simultaneamente foram preparados brancos, substituindo o substrato por seu respectivo solvente (branco de enzima), substituindo a enzima por seu respectivo solvente (branco de substrato) e substituindo o substrato e a enzima por seus respectivos solventes (branco amostra). A atividade de α -amilase foi expressa em miliunidades (mU) que corresponde à formação de um nanomol de glicose por minuto nas condições de ensaio. Os resultados da inibição da α -amilase foram expressos em UIA (unidade de inibição de α -amilase), que corresponde ao desaparecimento de 1 nanomol de glicose quando comparado com a atividade da amilase na ausência do inibidor (controle) por miligrama de matéria seca e em atividade específica (UIA mg⁻¹ de proteína).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os teores de umidade em triplicatas, das farinhas dos feijões Pérola, Majestoso, Valente, Branco e da faseolamina foram, em g100 g⁻¹ de 8,92±0,11, 8,20±0,13, 9,07±0,09, 7,12±0,15 e 8,8±0,10, respectivamente.

Composição centesimal

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da composição centesimal das farinhas de feijão e da faseolamina.

Tabela 1. Composição centesimal¹, em g100 g⁻¹ de matéria seca, da faseolamina e das farinhas de feijão.

Amostra	Proteína bruta	Extrato etéreo	Cinzas	Fibra bruta	ENN
Faseolamina	19,24±0,96	1,03±0,13	4,18±0,06	3,57±0,35	71,98±1,28
Branco	19,23±0,10	0,86±0,13	5,45±0,15	4,88±0,30	69,57±0,10
Pérola	18,83±0,22	2,03±0,11	5,00±0,06	7,13±0,11	67,01±0,37
Majestoso	17,78±0,46	1,19±0,04	5,46±0,23	7,06±0,13	68,50±0,22
Valente	19,08±0,38	0,87±0,13	5,08±0,08	8,27±0,58	66,68±0,79

¹ Dados são a média de 3 repetições ± desvio padrão da média.

O alto conteúdo protéico é uma característica marcante das sementes de leguminosas. Os teores de proteína encontrados nas farinhas dos feijões e na faseolamina variam de 17,78 a 19,24%, e estão de acordo com valores relatados por Osborn et al. (1988), que citam que a porcentagem de proteínas em feijão varia entre 16 e 33%. Donatel & Ferreira (1999), trabalhando com feijão carioca, obtiveram teores para proteína bruta de 19, extrato etéreo 1,29 e cinzas 5,05 (em g100 g⁻¹ MS). Valores semelhantes foram encontrados para os feijões cariocas utilizados neste trabalho. Para a cultivar Pérola os teores de proteína, extrato etéreo e cinzas foram respectivamente 18,83%, 2,03% e 5%, e para a cultivar Majestoso 17,78%, 1,19% e 5,46%, respectivamente. Ribeiro et al. (2005), estudando feijão preto obtiveram teor de ENN de 69,69 (em g 100 g⁻¹)MS, valor semelhante ao encontrado para o feijão preto, cultivar Valente, que foi de 66,68. Segundo Durigan (1985), os teores (em g100 g⁻¹) MS de extrato etéreo nos feijões variam de 1,03 a 1,59, ENN variam de 57,4 a 69,7 e cinzas de 3,67 a 5,11. Todos os feijões analisados apresentaram teores dentro da faixa descrita.

Apesar das variações encontradas nos teores dos constituintes químicos, pode-se notar que nenhuma das farinhas inclusive a faseolamina comercial fogem à composição centesimal típica, já descrita para grãos de feijão nas revisões de Zucas et al (1971) e Tobin & Carpenter (1978), seja pelo conteúdo protéico e de cinza, pelos baixos valores dos extratos etéreos e para os valores relativamente altos de extrato não nitrogenado (ENN).

Comparando-se a faseolamina com as demais farinhas (Tabela 1), observa-se que os teores de proteína, extrato etéreo e extrato não nitrogenado (ENN) foram praticamente iguais. O teor de cinzas encontrado para a faseolamina foi menor que o das farinhas dos feijões. O teor de fibra bruta foi mais próximo do feijão branco, sendo bem menor que o teor encontrado nas demais farinhas dos feijões. Os menores teores de cinzas e fibra bruta obtidos na faseolamina podem estar relacionados ao processo de obten-

ção desta, em que a casca (rica em fibra e cinzas) pode ter sido descartada. Ressalta-se que os teores de cinzas e fibra bruta na faseolamina são menores que os demais feijões analisados, mas estão dentro da faixa citada na literatura para feijões. A faseolamina é comercializada como uma glicoproteína extraída do feijão com efeito inibidor da α -amilase. Comparando mais especificamente a faseolamina, obtida segundo contato com o fabricante, a partir do feijão branco, com a farinha de feijão branco preparada neste experimento, observa-se apenas uma pequena diminuição no teor de cinzas e de fibra bruta na faseolamina.

Atividade anti-tríptica e anti-amilásica in vitro dos extratos protéicos brutos das farinhas de feijões e da faseolamina.

Na Tabela 2 são mostrados os resultados da inibição da α -amilase e da tripsina

A faseolamina apresentou atividade específica dos inibidores de tripsina e α -amilase próximos da farinha de feijão branco. A presença do inibidor de tripsina na amostra comercial sugere, como esperado, não tratar-se de um inibidor de α -amilase purificado.

Os efeitos nocivos dos inibidores de tripsina em animais alimentados com leguminosa crua são complexos. Muitos estudos com animais monogástricos têm atribuído a estes inibidores efeitos deletérios, principalmente alterações metabólicas do pâncreas (aumento da secreção enzimática, hipertrofia e hiperplasia) e redução da taxa de crescimento (Al-Wesali et al., 1995). Portanto ao detectar a presença do inibidor de tripsina, na faseolamina, constata-se que antes de recomendar o seu uso, deveriam ser investigados os benefícios e malefícios que tal recomendação poderia acarretar.

Utilizando-se farinhas de feijões com o objetivo de produzir um inibidor de α -amilase com finalidades terapêuticas, o feijão preto (cultivar valente), seria a melhor opção dentre os estudados, por apresentar maior teor de fibras, que segundo Lajolo et al. (1996), possuem reco-

Tabela 2. Inibição de α -amilase e tripsina na faseolamina e nas farinhas dos feijões.

Amostra	Inibidor de tripsina		Inibidor de α -amilase	
	Atividade UITmg MS ⁻¹	Atividade específica UIT mg proteína ⁻¹	Atividade UIA mg MS ⁻¹	Atividade específica UIA mg proteína ⁻¹
Faseolamina	11,13±0,71	239	5,58±0,25	120
Branco	9,61±0,21	215	6,02±0,28	134
Pérola	14,24±0,31	496	2,49±0,16	83
Majestoso	15,03±0,68	418	6,46±0,36	180
Valente	13,64±0,23	405	6,08±0,32	180

Unidade de inibição de tripsina (UIT) e unidade de inibição de amilase (UIA).
Dados são a média de 3 repetições \pm desvio padrão da média.

nhecido efeito hipocolesterolêmico e hipoglicêmico, menor teor de lipídeos e maior atividade específica de inibição da α -amilase. Há no entanto, necessidade de inativar o inibidor de tripsina.

CONCLUSÕES

A comparação entre a faseolamina e as farinhas de feijão mostrou que praticamente não há diferenças entre eles, principalmente em relação ao feijão branco. Testes de atividade hipoglicemiante e a determinação da dose adequada devem ser feitos para se definir o uso da faseolamina comercial.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- AL-WESALI, M. et al. The influence of pea seed trypsin inhibitors on the *in vitro* digestibility of casein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v.68, n.4, p.431-437, 1995.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 18. ed. Washington: 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1, p. 248-254, May. 1976.
- DONADEL, M. E.; FERREIRA, S. H. P. Propriedades funcionais de concentrado protéico de feijão envelhecido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.3, p. 380-386, 1999.
- ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271-278, Nov. 1961.
- GUPTA, Y. P. Antinutritional and toxic factors in food legumes: a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.37, n.3, p.201-208, 1987.
- KAMER, S. B. van de; GINKEL, L. van. Rapid determination of rufex fiber in cereals. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 19, n. 4, p. 239-251, 1952.
- LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I.; MENEZES, E.W. Qualidade nutricional. In: ARAUJO, S.R. et al. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFÓS, 1996. p. 23-56.
- LIENER, I. E.; DONATUCCI, D. A.; TARCZA, J. C. Starch blockers: a potential source of trypsin inhibitors and lectins. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 39, n.2, p. 196-200, Feb. 1984.
- NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques III. La α -amilase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amilase. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 31, n. 1, p. 286-290, 1948.
- OSBORN, T.C., BURROW, M., BLISS, F.A. Purification and characterization of arcelin seed protein from common beans. **Plant Physiology**, Lancaster, v.86, n.1, p.399, 1988.
- PARTEARROYO, M. A.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; CID, C. Sustancias antinutritivas en alimentos de origen vegetal. Su significado en la alimentación humana. **Alimentaria**, v. 267, p.115-120, 1995.
- RIBEIRO, H. J. S. S., FERREIRA, S. H. P., MIYAGUI, D. T. Propriedades físicas e químicas de feijão comum preto, cultivar iapar 44, após envelhecimento acelerado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p.165-169, 2005.
- SATHE, S. K.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. Dry beans of *Phaseolus*: a review I chemical composition: proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 20, n. 1, p. 1-46, 1984.
- TOBIN, G ; CARPENTER, K. T. The nutritional value of the dry bean (*Phaseolus vulgaris*): A literature review. **Nutrition Abstracts and Reviews**, Huddersfield, v. 48, n. 11, p. 919-936, 1978.
- ZUCAS, S. M.; LOURENÇO, E. J.; CAMPOS, M. A. P. Os feijões: seu valor nutritivo e substâncias indesejáveis. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DO FEIJÃO, 1971, Campinas, 1971.