

ÁREA TEMÁTICA:

- COMUNICAÇÃO
- CULTURA
- DIREITOS HUMANOS E JUSTIÇA
- EDUCAÇÃO
- MEIO AMBIENTE
- SAÚDE
- TRABALHO
- TECNOLOGIA

INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA AMILASE SALIVAR PELA FASEOLAMINA: O DESENVOLVIMENTO DE UMA AULA PRÁTICA DE BIOQUÍMICA

**Naiara de Oliveira Pazian (naiarapazian@hotmail.com)
Fernanda Teleginski (ferteleginski@hotmail.com)
Adriano Gonçalves Viana (adrianoviana@uepg.br)
Juliana Inaba (jinaba@uepg.br)**

RESUMO – Considerando a dificuldade dos conteúdos da Bioquímica, as aulas práticas se apresentam como auxiliadora no entendimento destes. Sendo assim, buscou-se desenvolver um roteiro de aula que aborde um dos principais assuntos desta disciplina: a atividade enzimática. A α -amilase é uma enzima presente na saliva humana, que é responsável por hidrolisar o amido, um dos principais componentes da nossa alimentação. A faseolamina, que é encontrada no feijão branco, é um inibidor da α -amilase, que por evitar a formação de açúcar pode ser utilizada no tratamento do *diabetes mellitus* do tipo II. Neste trabalho, um roteiro de aula prática para avaliar o efeito da faseolamina sobre a atividade da enzima salivar foi desenvolvido. Este roteiro permitirá que se trabalhe de forma concreta conceitos de atividade e inibição enzimática, além dos princípios de absorção e digestão de carboidratos e do *diabetes mellitus*.

PALAVRAS-CHAVE – Bioquímica. Aula prática. Faseolamina. Atividade Enzimática.

Introdução

A bioquímica é considerada por muitos alunos uma disciplina com conteúdo extenso e alto nível de dificuldade para o entendimento. Com isso, as aulas práticas tornam-se importantes pois ilustram o que já foi trabalhado em teoria, facilitando e reforçando a compreensão de conteúdo.

Um dos assuntos mais centrais da bioquímica e de alta complexidade é a atividade enzimática. Dado que praticamente todas as reações no nosso organismo são mediadas por enzimas, as quais atuam como catalisadores (HARVEY & FERRIER, 2012), é de suma importância a compreensão dos conceitos inseridos nesse tema.

A α -amilase (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) é uma enzima monomérica da família das endoamilases, presente na saliva humana, que atua sobre o amido e o glicogênio, polissacarídeos provenientes da nossa alimentação, hidrolisando ligações α -1,4 (HARVEY & FERRIER, 2012) (PEREIRA, 2008). O amido, é formado por um polímero linear de glucose, unidos por ligação α -1,4, denominado amilose, e outro, ramificado, formado por ligações de glucose α -1,4 e pontos de ramificação α -1,6, denominado amilopectina (CAMPBELL & FARRELL, 2007). A hidrólise dos polissacarídeos de glucose também ocorre no intestino, onde a α -amilase pancreática cliva as ligações glicosídicas, gerando polímeros menores, como a maltose (dissacarídeo de glucose), que será posteriormente clivada maltase, liberando as unidades de glucose, para a absorção intestinal e entrada no sistema circulatório para captação celular e geração de energia.

Alguns inibidores da α -amilase, que podem ser carboidratos, peptídeos ou proteínas, são chamados de fatores antinutricionais, já que interferem na digestibilidade dos polissacarídeos (BENEVIDES, 2011). Eles são utilizados como ferramenta de auxílio no tratamento e prevenção do *diabetes mellitus* do tipo II, uma vez que diminui os índices glicêmicos provenientes da ingestão do amido e do glicogênio, além da diminuição nos depósitos de triglicérides no tecido adiposo, pelo excesso de glucose no tecido hepático (IGUTI, 1993).

Uns dos inibidores de α -amilase mais conhecidos são os provenientes das sementes de leguminosas, como soja e feijão, e fazem parte do seu mecanismo de defesa contra pragas e patógenos. Os inibidores possuem alça ligante exposta formando um complexo enzima-inibidor, através de pontes de hidrogênio e ligações de Van der Waals. Entretanto, podem provocar efeitos nocivos aos animais, devido à formação de complexos inativos com outras enzimas importantes para a digestão de proteínas como a tripsina e a quimiotripsina (PEREIRA, 2008).

Objetivos

A faseolamina é uma glicoproteína presente no feijão branco com atividade inibidora da α -amilase. Atualmente, tem sido muito utilizada para redução de peso e como hipoglicemiante. Neste trabalho, buscou-se verificar e demonstrar a atividade inibidora dessa glicoproteína sobre a amilase salivar para o desenvolvimento de um roteiro de aula prática da disciplina de Bioquímica Básica.

Referencial teórico-metodológico

Primeiramente, analisou-se alguns referenciais encontrados sobre a atividade enzimática, principalmente da amilase salivar (Bioquímica: aulas práticas, UFPR, 2001) e sobre a atividade da faseolamina (PEREIRA, 2008) e que fossem passíveis de adaptação e desenvolvimento de um novo roteiro de aula prática de bioquímica para realização no Laboratório de Bioquímica Básica na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Com isso, objetivou-se a elaboração de uma prática que demonstrasse a ação da amilase salivar sobre o amido, e de inibição pela faseolamina, utilizando os conceitos básicos de hidrólise e inibição da atividade enzimática. Para acompanhar esses resultados utilizou-se a técnica do lugol e do DNS (3-5-dinitrosalicilato).

Para a metodologia, foram adicionados a 4 tubos de ensaio, 5mL de solução de amido 1%. Adicionou-se nos tubos (2) 0,2mL de saliva à 10% em água destilada com faseolamina triturada para diluir toda a saliva, (3) 0,2mL de saliva à 10% diluída com água destilada e (4) 0,2mL de saliva à 10% diluída com água destilada pré-preparada com pó de faseolamina, fervido em banho-maria à 100 °C por 10 minutos. O tubo (1) foi incubado apenas com os 5mL de amido (controle). Todos os tubos foram mantidos a 37 °C por 5 minutos. Após a incubação, retirou-se de cada sistema duas alíquotas de 0,2mL, uma para o teste detecção da presença de unidades monossacarídicas liberadas pelo teste do DNS e para o teste do lugol, que detecta a presença do amido.

Para o teste do lugol adicionou-se ao sistema com 0,2mL provenientes de cada tubo anterior, 3 gotas de lugol e 10mL de água destilada.

Para o teste do DNS, adicionou-se ao sistema 0,2mL de cada amostra, 1,3mL de água destilada e 1mL de DNS (que é preparado pela dissolução de 5 gramas de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 100mL de NaOH 2 mol.L⁻¹) e levado à fervura em banho-maria à 100 °C por 5 minutos. Após isso, completou-se o sistema com 7,5mL de água destilada e realizou-se a leitura de Absorbância dos tubos em espectrofotômetro em 540nm.

Resultados

O teste do lugol é amplamente utilizado devido à facilidade e rapidez dos resultados. As moléculas de amido podem ter diferentes graus de ramificação, onde a conformação mais

comum da amilose é uma hélice com seis resíduos em volta, que quando moléculas de iodo (presentes no lugol) se encaixam dentro dessa hélice, formam um complexo de amido-iodo, que possui cor azul-escuro característica (CAMPBELL & FARRELL, 2007). Com essa formação de coloração é possível identificar a presença ou não do amido e assim verificar a atividade da α -amilase salivar.

No tubo (1), devido à sua forte coloração, é possível verificar a presença do amido íntegro. Já no tubo (2), adicionou-se a solução de saliva na presença da faseolamina, a qual forma um composto com a enzima α -amilase e a inativa, evitando a hidrólise do amido, comprovada pela coloração característica. No tubo (3), onde há a presença do amido e da α -amilase salivar, não houve a formação de coloração azulada característica da presença do amido. Isso ocorreu porque a enzima é uma endoamilase que catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 da amilose e produz na clivagem inicial, oligossacarídeos de 6 ou 7 unidades de glucose, que serão posteriormente degradados à maltotriose e maltose (UFPR, 2001). No tubo (4) a saliva e a faseolamina foram previamente fervidas, promovendo a desnaturação e inativação da α -amilase e com isso foi evidenciada a hidrólise do amido, ocorrendo a formação de coloração azulada semelhante ao tubo (1), que só continha o amido.

Figura 1: Ação da α -amilase salivar sobre o amido e sua inibição pela faseolamina e calor evidenciada pela coloração com lugol.

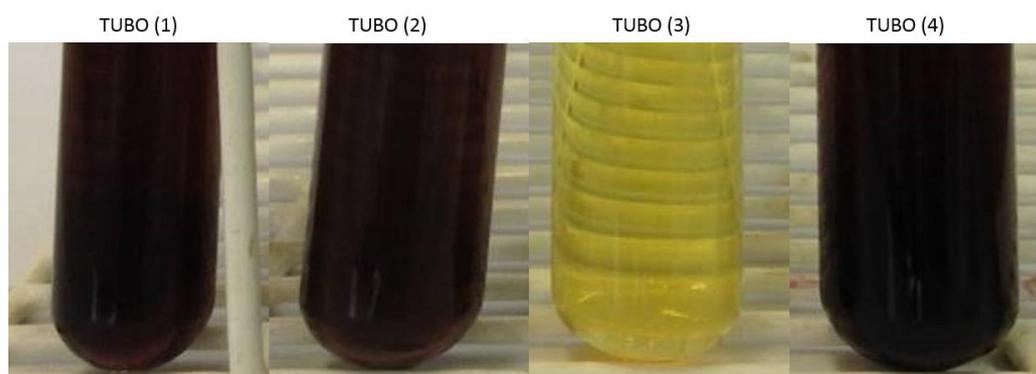
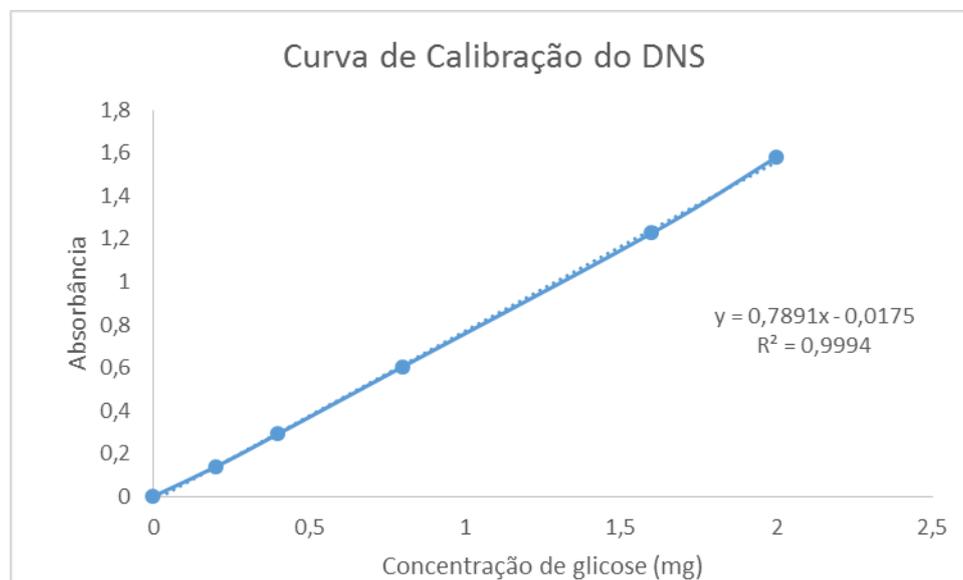


Figura 1: (1) Amido, (2) amido + saliva diluída + faseolamina, (3) amido + saliva diluída, (4) amido + saliva diluída + faseolamina fervida a 100 °C.

A reação com o 3,5-di-nitrosalicilato (DNS) se dá pela reação entre as unidades monossacarídicas de glucose liberadas (açúcar redutor) e uma molécula de DNS (com coloração amarelo forte), que é reduzida a 3-amino-5-nitro salicilato (com coloração laranja-marrom forte), cuja coloração pode ser avaliada por determinação da luz absorvida a 540

nanômetros. A concentração de açúcar redutor presente na solução pode ser determinada utilizando uma curva de calibração de glicose.

Gráfico 1: Curva de Calibração do reativo DNS (3,5-di-nitrosalicilato) relacionando a absorbância obtida com a concentração de glicose do sistema em miligramas.



Com a construção de uma curva de calibração realizada com os mesmos reagentes utilizados nos sistemas, obteve-se um R^2 igual à 0,9994, o que indica resultados confiáveis dessa construção, e uma equação que descreve a reta $y=0,7891x-0,0175$ (Gráfico 1).

Após a construção da curva de calibração do reativo DNS foi possível calcular a concentração de glicose nos sistemas montados. O tubo (1) foi utilizado como “branco” das amostras e por isso sua concentração de glicose resultou em 0 mg.mL^{-1} . O tubo (2) revelou a presença $1,498 \text{ mg.mL}^{-1}$ de açúcar. No tubo (3) a enzima α -amilase atuou realizando o processo de hidrólise no amido, formando assim grande quantidade de glicose livre ($2,297 \text{ mg.mL}^{-1}$). Quando comparado ao tubo (2), pode-se evidenciar que houve inibição parcial da α -amilase pela faseolamina (34,79%). Já no tubo (4), contendo amido, saliva diluída e faseolamina inativada pelo calor, foi detectada a presença de $1,297 \text{ mg/mL}$ de açúcar demonstrando a sua pouca atividade e inativação enzimática devido ao tratamento térmico, que promove rompimento das ligações fracas (pontes de hidrogênio, interações de cargas e hidrofóbicas) e desnaturação da enzima, inativando-a.

Considerações Finais

Com a realização dos dois métodos de revelação da atividade e inibição enzimática, foi possível comprovar a ação da faseolamina sobre a α -amilase, presente na saliva humana, e justificar a sua ampla utilização para fins hipoglicemiantes em pacientes com *diabetes mellitus* tipo II ou pré-diabéticos. Além disso, foi possível a elaboração de um roteiro de prática para a disciplina de bioquímica, envolvendo conceitos básicos e iniciais de enzimas e sua atividade.

APOIO: Técnico Ozires Dutra e Fundação Araucária.

Referências

BENEVIDES, C.M.J.; SOUZA, M.V.; SOUZA, R.D.B.; LOPES, M.V. **Fatores antinutricionais em alimentos: Revisão**. Universidade do Estado da Bahia. Bahia. 2011.

CAMPBELL, M. K.; FARREL, S. O. **Bioquímica**. 5ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. **Bioquímica-Aulas Práticas**. 6ª Edição, Curitiba, Editora UFPR, 2001.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

IGUTI, A. M. **Caracterização e síntese dos inibidores de α -amilase do feijão (*Phaseolus vulgaris*)**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo. 1993.

PEREIRA, L.L.S. **Estudo comparativo entre faseolamina comercial e farinha de feijão como perspectiva ao tratamento da obesidade e do Diabetes Mellitus tipo 2**. Tese de mestrado. Universidade Federal de Lavras. 2008.