



**KENNEDY BORGES OLIVEIRA**

**PURIFICAÇÃO DE FASEOLAMINA DE FEIJÃO BRANCO  
(*Pasheolus vulgaris L.*) POR CROMATOLOGRAFIA DE TROCA  
IÔNICA EM COLUNA DE CRIOGEL**

**Lavras – MG**

**2023**

**KENNEDY BORGES OLIVEIRA**

**PURIFICAÇÃO DE FASEOLAMINA DE FEIJÃO BRANCO (*Pasheolus vulgaris L.*)  
POR CROMATOGRÁFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE CRIOGEL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras – UFLA, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Prof. Dr. Luís Antônio Minim.  
Orientador

Dr (a). Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo  
Co-orientadora

**Lavras – MG  
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Oliveira, Kennedy Borges.

Purificação de faseolamina de feijão branco (*Phaseolus vulgaris*  
*L.*) por cromatografia de troca iônica em coluna de criogel. /  
Kennedy Borges Oliveira. - 2023.

58 p. : il.

Orientador(a): Luis Antônio Minim.

Coorientador(a): Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Criogel. 2. Troca iônica. 3. Captura. I. Minim, Luis Antônio.  
II. Veríssimo, Lizzy Ayra Alcântara. III. Título.

**KENNEDY BORGES OLIVEIRA**

**PURIFICAÇÃO DE FASEOLAMINA DE FEIJÃO BRANCO (*Phaseolus vulgaris* L.)  
POR CROMATOGRÁFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE CRIOGEL**

**PURIFICATION OF PHASEOLAMINE FROM WHITE BEANS (*Phaseolus vulgaris*  
L.) BY ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY IN CRYOGEL COLUMN**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras – UFLA, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

APROVADA em 30 de junho de 2023.

Dra. Renata Cristina Ferreira Bonomo UESB  
Dra. Katia Silva Maciel UFV

Dr. Luis Antônio Minim  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2023**

À Deus que é o Senhor da minha vida.  
Ao meu pai (*in memoria*) e a minha mãe.

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela sua bondade e por me guiar pelos melhores caminhos, pois sem ele eu não teria chegado até aqui.

À minha mãe por todo incentivo, compreensão, paciência e por sempre acreditar em mim. Ao meu pai (*in memoria*), que mesmo não estando presente fisicamente, me deu proteção e acalmou meu coração nos momentos em que eu mais precisei. Aos meus irmãos e a toda minha família, ao meu namorado e amigos que sempre apoiaram todas as minhas escolhas.

Ao meu Orientador Luis Antônio Minim pela orientação, apoio, pelo saber compartilhado e por todas as palavras de incentivo

À minha Coorientadora Lizzy, pela paciência, colaboração, confiança, orientações e sugestões úteis durante a execução do projeto.

A todos os professores da Universidade Federal de Lavras que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, pela oportunidade e por proporcionar as melhores ferramentas que me permitiram chegar ao final desta etapa de forma satisfatória.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) por disponibilizar o laboratório (LADESP e NuBioMol) para realização de análises deste mestrado.

À Ana Cristina e a Katia, que desde o início contribuiu na elaboração de todos os testes e análise dos dados.

Aos colegas, professores e técnicos dos demais laboratórios que cederam espaço, equipamentos ou material para realização das análises, em especial a Creuza do laboratório de laticínios que foi uma conselheira nos momentos difíceis e uma grande amiga.

A todos os amigos que colaboraram de alguma forma, para a realização desse trabalho, agradeço imensamente pelo auxílio e disposição de cada um, pela amizade e momentos de descontração. Vocês com certeza fizeram parte desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa de estudo ao mestrado, que foi excepcional para minha formação.

## RESUMO

A faseolamina é uma proteína de origem vegetal, encontrada apenas em leguminosas como o feijão branco. É uma proteína que tem sido muito utilizada para reduzir o sobrepeso e também tem sido foco de muitos estudos, pois possui capacidade como um anti-hiperglicemiante em portadores de diabetes, sendo justificado a necessidade de obtenção dessa proteína com elevado grau de pureza. Os criogéis supermacroporosos podem ser usados como suportes cromatográficos para purificação de proteínas, principalmente quando se deseja manter a bioatividade da molécula alvo. Assim, foi desenvolvido um criogel de poliacrilamida funcionalizado com polietilenoimina (PEI) para ser utilizado como um trocador aniônico em estudos de adsorção de faseolamina em diferentes condições de pH (7,2, 7,8 e 8,4) e concentração de sal [TRIS-HCl] (20 mM, 60 mM e 100 mM). O criogel funcionalizado com PEI (cryo-PEI) apresentou poros interconectados, estrutura uniforme e esponjosa, coloração esbranquiçada. O cryo-PEI apresentou baixa resistência ao fluxo e permeabilidade ( $K_w$ ) de  $5,03 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ . Os resultados de dispersão axial ( $D_{AX}$ ) do cryo-PEI foram bons, variando de  $2,75 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$  a  $3,27 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ . Foi possível observar as melhores condições em pH 7,8 e concentração de sal de 100mM TRIS-HCl para o rendimento e o fator de purificação, resultando no maior fator de purificação (10,838) e maior rendimento (149,706%). Este estudo demonstrou um método de purificação bem sucedido para a captura de faseolamina por cromatografia de troca iônica.

**Palavras-chaves:** Troca iônica. Criogel. Feijão Branco. Proteína. Captura

## ABSTRACT

Phaseolamine is a protein of plant origin, found only in legumes such as white beans. It is a protein that has been widely used to reduce overweight and has also been the focus of many studies, as it has the ability to be an anti-hyperglycemic in patients with diabetes, justifying the need to obtain this protein with a high degree of purity. Supermacroporous cryogels can be used as chromatographic supports for protein purification, especially when it is desired to maintain the bioactivity of the target molecule. Thus, a polyacrylamide cryogel functionalized with polyethyleneimine (PEI) was developed to be used as an anion exchanger in phaseolamine adsorption studies under different conditions of pH (7,2, 7,8 and 8,4) and salt concentration [TRIS-HCl] (20 mM, 60 mM and 100 mM). The cryogel functionalized with PEI (cryo-PEI) showed interconnected pores, uniform and spongy structure, whitish color. The cryo-PEI showed low flow resistance and permeability ( $K_w$ ) of  $5,03 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ . The axial dispersion (DAX) results of the cryo-PEI were good, ranging from  $2,75 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$  to  $3,27 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ . It was possible to observe the best conditions at pH 7,8 and salt concentration of 100mM TRIS-HCl for yield and purification factor, resulting in the highest purification factor (10,838) and highest yield (149,706%). This study demonstrated a successful purification method for capturing phaseolamine by ion exchange chromatography.

**Keywords:** Ion Exchange. Criogel. White Beans. Protein. Capture.



## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

**Figura 1:** Etapas de separação de proteínas utilizando a técnica de cromatográfica de troca iônica. Fonte: Adaptado de Acikara (2016)..... 23

### SEGUNDA PARTE

**Figura 1:** Dados experimentais de queda de pressão em diferentes velocidades de fluxo de água (●) e equação ajustada para determinar a permeabilidade ..... 45

**Figura 2:** Micrografia do Criogel a 500x .....46

**Figura 3:** Curvas de distribuição de tempo de residência para pulsos de acetona em diferentes fluxos velocidades, na coluna de criogel de troca iônica (0,5 cm/min a 5,0 cm/min) ..... 47

**Figura 4:** Coeficientes de dispersão axial ( $D_{ax}$ ) em diferentes velocidades de superfície da fase móvel através da coluna de criogel de troca iônica .....48

**Figura 5:** Altura equivalente a uma placa teórica em diferentes fluxos de fase móvel (0,5 cm/min a 7 cm/min), na coluna de criogel aniônico .....48

**Figura 6:** Superfície de resposta do Fator de purificação em função de pH e Tris .....52

**Figura 7:** Análise SDS-PAGE do processo de purificação cromatográfica de Faseolamina de feijão branco por criogel de troca iônica em uma única etapa. Padrão: Marcador Molecular; T1 a T9: tratamentos seguindo o delineamento de face centrada conforme mostrado na Tabela 1 .....54

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

<b>Tabela 1:</b> Fatores e níveis do delineamento de face centrada .....	42
<b>Tabela 2:</b> Condições experimentais do ensaio de adsorção e purificação de proteínas e resultados de Concentração de proteína Alimentação ( $P_A$ ), Atividade Volumétrica na Alimentação ( $A_A$ ), Atividade Especifica na Alimentação ( $A_{SA}$ ), Concentração de proteína no eluído ( $P_E$ ), Atividade Volumétrica no Eluído ( $A_E$ ), Atividade Especifica Eluido ( $A_{SE}$ ) Fator de Purificação ( $F_P$ ) e Rendimento ( $R$ ) de faseolamina no eluído, em função de diferentes condições de pH e de diferentes concentrações de Tris-HCl .....	52

## LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIACÖES

Abs	Absorbância registrada
AAm	Acrilamida
MBAam	N,N'- metileno(bis)acrilamida
AGE	Alil glicidil éter
APS	Persulfato de amônio
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamina
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
VC	Volumes de coluna
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
DTR	Distribuição do tempo de residência
S	Capacidade de inchamento
<i>Dax</i>	Coefficiente de dispersão axial
HEPT	Altura equivalente de prato teórico
Kw	Permeabilidade ao escoamento (m <sup>2</sup> )
m/v	Massa por volume
tR	Tempo de retenção
$\Delta P_w$	Queda de pressão através da coluna (Pa)
$\sigma^2$	Variância do pulso observado (s <sup>2</sup> )
$\mu_w$	Viscosidade da água (Pa s <sup>-1</sup> )
q	Capacidade de adsorção (mg g <sup>-1</sup> )
TRIS-HCl	Tris-(hidroximetil)-aminometano
$\alpha - AI$	Inibidor alfa-amilase
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2.REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Proteínas do feijão branco</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2 Inibidores das enzimas digestivas</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3 Faseolaminas</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4 Fatores mais estudados na separação e purificação de proteínas</b> .....	<b>17</b>
<b>2.5 Cromatografia</b> .....	<b>18</b>
<b>2.6 Cromatografia de troca iônica</b> .....	<b>19</b>
<b>2.7 Criogel: síntese, estrutura e aplicações</b> .....	<b>21</b>
<b>3.CONCLUSÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>4.REFERÊNCIAS</b> .....	<b>25</b>
<b>SEGUNDA PARTE: ARTIGO</b> .....	<b>31</b>
<b>ARTIGO 1 - PURIFICAÇÃO DE FASEOLAMINA DE FEIJÃO BRANCO (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE CRIOGEL</b> .....	<b>31</b>
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>2.MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
<b>3.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>4.CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>5.REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

A maior parte da dieta humana é constituída por carboidratos, cuja ingestão em excesso acarreta aumento de peso corporal, tendo, como consequência, problemas como hipertensão, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, dentre outros. A condição de sobrepeso e a obesidade vem aumentando rapidamente na população mundial, sendo considerados como um problema de saúde pública, associado à redução da expectativa de vida. Neste sentido, a introdução de suplementos alimentares que reduzam a ingestão e absorção de carboidratos tem se tornado uma prática, podendo para isso serem utilizados inibidores de enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilases).

Inibidores das enzimas digestivas podem ser encontrados em diversas fontes alimentícias, tal como o feijão, produto alimentar consumido pela maioria dos brasileiros. Alguns dos inibidores são considerados inibidores específicos, como a glicoproteína faseolamina, uma proteína oligomérica composta por três subunidades polipeptídicas com massa molecular entre 43 a 54 kDa. Essa proteína é extraída do feijão comum e do feijão branco e atua principalmente na inibição da enzima  $\alpha$ -amilase humana.

Diante do papel importante e das funcionalidades que as proteínas possuem, destacando-se a faseolamina que está presente no feijão branco, é necessário a aplicação de técnicas específicas para a obtenção dessas proteínas com certo grau de pureza, incluindo desde o processo de extração, separação e principalmente as etapas de purificação. Assim, muitas técnicas de separação tem sido estudadas e encontra-se um destaque especial para as técnicas cromatográficas, que tem conferindo principalmente uma maior purificação.

A extração e purificação da faseolamina é objeto de estudo desde a década de 1980. Sua separação engloba a precipitação, diálise, tratamento térmico e cromatografia, como exclusão molecular, troca iônica e interações hidrofóbicas. Estas técnicas apresentam limitações em seu uso, uma vez que, para obter resultados satisfatórios, faz-se necessário a aplicação de várias etapas no processo. A cromatografia por troca iônica, que se baseia na separação de biomoléculas ionizáveis de acordo com sua carga elétrica superficial é um método amplamente empregado na separação de aminoácidos, peptídeos e proteínas, fazendo o reconhecimento entre o ligante e uma dada proteína, podendo promover a interação ou uma redução de

interações, e também proporciona o aumento do rendimento operacional e elimina facilmente contaminantes indesejáveis.

Adsorventes funcionalizados com polietilenoimina têm atraído a atenção em aplicações para purificações. A quaternização da polietilenoimina resulta em um trocador aniônio, de tal forma que sua interação com proteínas ocorre através de forças eletrostáticas. Essa técnica tem demonstrado vantagens em termos de simplicidade e eficiência econômica em comparação com outras técnicas baseadas na proteína A. Sendo assim, neste projeto foi estudada a purificação da faseolamina a partir do isolado proteico do feijão branco, utilizando cromatografia por troca iônica. Foi produzido um criogel de poli(acrilamida) e a sua ativação consistiu de ligação de polietilenoimina sobre os grupos epoxis e posterior quaternização com epiclorohidrina. O isolado proteico foi obtido por solubilização alcalina da farinha do feijão.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Proteínas do feijão branco**

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris L.*) é uma semente dicotiledônia, pertencente à família Fabaceae e é considerado um dos alimentos mais importantes da dieta do brasileiro. Composto por componentes químicos como, proteínas (20-30%), carboidratos (60%), fibras (24-30%), cálcio, ferro, fosfato de potássio, magnésio, lipídios, glicídios, vitaminas do complexo B (KAN et al., 2017), e diversas propriedades medicinais, dentre elas fortalecedora, hipoglicêmica e nutritiva. É uma das principais fontes de proteína vegetal e possui, em matéria seca, cerca de 26% de proteína na sua totalidade (IRSHAD; SHARMA, 1981).

Por ser um produto de alto valor nutricional e de baixo custo, o feijão é considerado a leguminosa principal em diversos países em desenvolvimento, principalmente na dieta da população de baixa renda, e possivelmente a única fonte diária de proteína. Mesmo sendo observado uma queda em relação ao consumo de feijão nas últimas décadas, pesquisas mostram que para os brasileiros ele ainda é considerado como um alimento de alto potencial nutricional (NÖRNBERG, 2022). O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2023) realizou uma pesquisa estimando que o consumo médio no país é de 182,9 g/dia, sendo que as mulheres consomem cerca de 79,4% dessa totalidade. A farinha de feijão branco é amplamente comercializada pela internet ou no comércio local. Por não se tratar de um produto purificado, os efeitos do seu uso são desconhecidos, podendo apresentar possíveis malefícios decorrentes, principalmente, da presença de componentes anti-nutricionais na sua composição. De acordo com a literatura, grande parte dos suplementos para controle de peso não possui estudos que justifiquem seu uso (testes em seres humanos) (SILVA; FERREIRA,

2014). Dado a grande importância do consumo da farinha branca é possível destacar as proteínas que existem em diversas variedades do feijão.

Existe uma grande variedade de feijão, e uma das variações é o feijão branco (*Phaseolus vulgaris L.*) que está dentro da família Fabaceae. No Brasil, esse feijão vem sendo cada vez mais consumido e indicado para pessoas com alto índice de obesidade. Atualmente, essa doença tem sido um dos maiores problemas de saúde pública, se tornando um fator preocupante. Seu tratamento é imprescindível, pois acarreta o surgimento de outras diversas doenças crônicas (COELHO, 2018). Em regiões de alta produção de feijão branco, além do comércio dos grãos, tem-se comercializado também a sua farinha. Para regiões onde a produção é menor tem chegado também este subproduto através do comércio pela internet (SILVA et al., 2014).

As proteínas podem ser classificadas, de acordo a sua estrutura, em albuminas, globulinas, prolaminas e gluteninas (DURIGAN et al., 1987). Por conta do alto teor de aminoácidos essenciais (lisina, leucina, isoleucina, asparagina, glutamina) e baixo teor de sulfurados (metionina, cisteína, triptofano, valina, tirosina), o consumo do feijão branco necessita de reforço nutricional, que é encontrado ao combinar cereais, como arroz, milho e/ou trigo, na dieta para balancear a ingestão desses nutrientes (MONTROYA et al., 2010).

A proteína do feijão possui um valor nutritivo de proteína baixo quando se utiliza o feijão com a única fonte proteica, pois este possui baixos teores de aminoácidos sulfurados. Porém, quando combinado com outros alimentos como como o arroz, juntos fornecem uma mistura de proteínas significativa e nutritiva. Em relação a produtos de origem animal que também fornecem proteínas, o feijão tem essa importância alimentar devido ao menor custo de aquisição e por isso existem inúmeros trabalhos com esse vegetal e ele tem se destacado nas pesquisas (MESQUITA e RIVIELLI, 2007).

As sementes de feijão acumulam reservas durante o seu desenvolvimento, sendo essas reservas constituídas em sua maior parte de proteínas, como as globulinas. Essas proteínas podem ser classificadas de acordo com seu coeficiente de sedimentação, como 7S (grupo das vicilinas) com 40-50% do nitrogênio total do grão e 11S (grupo das leguminas) com 10% de nitrogênio total. Esses grupos podem limitar o acesso de enzimas proteolíticas (MONTROYA et al., 2010; CHAGAS; SANTORO, 1997; DURANTI; GIUS, 1997). As vicilinas estão presentes nas sementes na sua forma trimérica, com massas moleculares que variam de 140 a 190 kDa. A faseolamina é classificada como uma vicilina e tem a sua estabilidade estrutural trimérica mantida por forças intramoleculares do tipo hidrofóbicas, eletrostáticas e pontes de hidrogênio. As pontes dissulfídicas não contribuem na manutenção da estabilidade. Apresenta temperatura de desnaturação de aproximadamente 90 °C, em pH 7 (tampão fosfato 10 mmol.L<sup>-1</sup>); sua estrutura é desnovelada quando em presença dos íons iodeto (1 M) ou tiocianato (1 M), com pH 7 (MARSHALL; LAUDA, 1975; YIN et al., 2008). A depender do pH do meio, a faseolamina tende a possuir comportamento de associação-dissociação da cadeia polipeptídica, onde, em altas variações de pH, ocorrem alterações nas características estruturais e de sedimentação. As

formas trimérica (160 kDa), dodecamérica (650 kDa) e monomérica (50 kDa) apresentam conformações distintas umas das outras, uma vez que a forma trimérica da vicilina é formada em estado de alta acidez, neutralidade e baixa alcalinidade, sendo as demais formas formadas em condições contrárias (SUN et al., 1975).

No feijão comum foi descoberto presença de alguns compostos bioativos como polifenóis, flavonoides, fibras alimentares (amido resistente, polissacarídeo não amiláceo) e também a faseolamina que é considerada como um inibidor de  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -AI). Desses compostos, o que vem sendo mais estudado no feijão é a faseolamina, pelo fato de apresentar efeitos anti-obesidade, pois é capaz de inibir a saliva e a amilase pancreática, impedindo a hidrólise do amido nos alimentos. O potencial de inibição da  $\alpha$ -amilase faz com que tenha uma diminuição de carboidratos principais e também modula a microbiota intestinal composta in vivo, assim, a faseolamina pode ser utilizada para restringir a síntese de gordura sem causar efeitos colaterais (SHI et al., 2021).

Udani et al., (2009) fez um estudo onde utilizou-se um extrato de feijão branco para diminuir o índice glicêmico em humanos. Foi produzido um extrato aquoso de feijão branco (*Phaseolus vulgaris* L.) com uma padronização descrita na literatura de forma a inibir a alfa-amilase. O feijão foi moído e extraído por 4 horas, em seguida o líquido foi filtrado e concentrado sob vácuo. O extrato foi novamente filtrado e, em seguida, pasteurizado antes de ser seco por spray para obtenção do pó. O produto foi dosado em pó (misturado na manteiga) e em cápsulas. Para testar se houve redução do índice glicêmico, foram feitas formulações com e sem inserção do extrato de feijão branco no pão branco, seguindo para aplicação em 10 indivíduos e concluído de acordo com as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS) com metodologia padrão usando glicose como alimento padrão. Utilizando dosagem e formulação apropriada, o extrato de feijão branco mostrou ser um método novo e potencialmente eficaz para reduzir o Índice Glicêmico (IG) de alimentos existentes, sem modificar seu perfil de ingrediente. Dado o interesse e os benefícios potenciais das dietas de baixo IG, estudos adicionais da produção do extrato e inserção no pão, com uma amostragem populacional de estudo maior e em combinação com outros alimentos com alto IG são indicados para uma maior contribuição de resultados, bem como confirmação de ação inibidora da alfa-amilase.

## 2.2 Inibidores das enzimas digestivas

Inibidores da enzima  $\alpha$ -amilase (1-4  $\alpha$  D-glucanglucanohidrolase, EC 3.2.1.1) são comuns em plantas, alguns cereais como trigo e centeio e presentes no feijão. Essa enzima tem a função de hidrolisar polissacarídeos, como o amido ou glicogênio, em moléculas de maltose (primeiro produto obtido após a digestão – glicose-glicose) e dextrinas. São encontrados poucos trabalhos que certificam a presença do inibidor da  $\alpha$ -amilase no feijão, entretanto, Marshal e Lauda (1975) encontraram após etapas de purificações, propriedades proteicas nesse inibidor.



Existem seis classes de inibidores proteicos de  $\alpha$ -amilase encontrados em plantas superiores e podem ser definidas pela similaridade na sequência e estrutura tridimensional. As seis classes correspondem aos tipos: lectina, knotina; inibidor AA1; kunitz; taumatina e -purotionina. (BOLETI et al., 2007; GAD et al., 2006).

O feijão comum possui três isoformas com potencial de inibição da  $\alpha$ -amilase sendo, alfa-A1, alfa-A12, alfa-AI. Destas, existem estudos específicos voltados para a forma iso alfa-AI por possuir atividade anti-amilase em seres humanos. Essa enzima é encontrada apenas nos eixos embrionários e nos cotilédones dessa planta e não é encontrada em outros órgãos da planta. Ela é classificada como uma proteína de defesa da semente ou como anti-alimentar, devido a não ser ático contra as  $\alpha$ -amilases de vegetais. O inibidor da alfa-amilase previne a digestão do amido, promovendo um bloqueio total ao sítio dessa enzima. Existem alguns fatores que afetam diretamente a atividade do inibidor da isoforma alfa-AI, sendo eles, o pH, a temperatura, o tempo de incubação e a presença de íons específicos. O pH e a temperatura ótima para o inibidor são respectivamente 4,5 a 5,5 e de 22 a 37°C, e não existe atividade a 0 °C, ocorrendo assim a inibição completa por fervura durante um tempo de 10 minutos. Com diferentes estudos estima-se que o período ideal de incubação seja em intervalos de 10, 40 e 120 minutos. Acredita-se que os diferentes usos de condições de testes em casa ensaio, como pH de 6,9 em incubações mais longas e um pH de 4,5 para os períodos de incubação menores que ocasiona em resultados diferentes de tempos de incubação, como o apresentado anteriormente (BARRETT e UDANI, 2011).

### 2.3 Faseolaminas

A faseolamina é uma proteína de origem vegetal encontrada exclusivamente em leguminosa, como o feijão branco (*Phaseolus vulgaris L.*) (KAN et al., 2016). Utiliza-se essa proteína para reduzir o sobrepeso e efeito hipoglicemiante em pacientes portadores de Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT) como por exemplo, portadores de diabetes. Para indivíduos que possuem altos valores do IMC (Índice de Massa Corporal), faz-se necessário a introdução dessa proteína na dieta, uma vez que a mesma reduz indiretamente o teor de glicose absorvido pelo organismo ao ingerir alimentos ricos em amido (ZHU; JIANG; THOMPSON, 2012). Isso só é possível devido à ação da faseolamina, uma inibidora da enzima  $\alpha$ -amilase, que inibe a digestão de amido (ARBO et al., 2009).

Por esses fatos, a faseolamina é considerada um fitoterápico eficaz para a redução do sobrepeso e doenças relacionadas à obesidade. De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada nº48 de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os fitoterápicos são: “todos os medicamentos preparados exclusivamente com plantas ou partes de plantas medicinais, como, por exemplo, cascas, raízes, sementes, frutos, flores ou folhas as

quais tenham propriedades sendo reconhecidas como prevenção, diagnóstico, ou tratamento de doenças”. Existem algumas contraindicações para o uso da proteína faseolamina por hipoglicêmicos e gestantes, uma vez que se faz necessário a absorção de macromoléculas como a glicose para esse tipo de patologia e/ou situação (CINTRA, 2014)

Os primeiros estudos com a faseolamina do feijão branco foram realizados por MARSHALL; LAUDA, (1975). Os autores afirmaram que a faseolamina é uma glicoproteína de massa molar entre 45 e 55 kDa, sendo ela específica para inibição da  $\alpha$ -amilase animal, mas não atua sobre as  $\alpha$ -amilases bacterianas e de plantas. A faseolamina tem um baixo grau de hidrólise devido à sua estrutura compacta e rígida e ao fato de não ser muito hidrofílica (MONTOYA et al., 2010).

A faseolamina é a maior proteína de armazenamento do feijão. É uma proteína oligomérica composta por três subunidades polipeptídicas  $-\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ - com massa molecular entre 43 a 55 kDa (YIN et al., 2008). Durigan et al. (1987) avaliaram o conteúdo de globulinas e albuminas em 12 cultivares de feijão brasileiro. É observada uma variação de globulinas e albuminas de (33,4 a 52,9)% e (9,2 a 20,1)%, respectivamente. A faseolamina (fração 7S), principal fração globulínica, representa 40 a 50% do nitrogênio total do grão, enquanto na 11S representa apenas 10%.

Pode-se encontrar faseolamina disponível no mercado, em diferentes graus de atividade, a depender da sua fonte comercial e também pode ser encontrada em diversos suplementos que são utilizados em dietas e também em produtos voltados para esse fim (OLIVEIRA et al., 2014). Nota-se que vários estudos vêm avaliando a faseolamina para verificar a sua eficácia como inibidor de amido através de extratos purificados. Ainda se esperam avanços nesses processos de extração, purificação e padronização de proteínas de vegetais como os das plantas de feijão, buscando sempre um melhor índice de resultados quanto a atividade de inibição desse carboidrato (MICHELI, 2019).

#### **2.4 Fatores mais estudados na separação e purificação de proteínas**

As proteínas do feijão branco são divididas em quatro frações: albumina, que apresenta solubilidade em água; globulinas que são insolúveis em água, mas solúveis em soluções salinas; prolaminas, que apresentam solubilidade em solução alcoólica relativamente fortes (60 - 70%), entretanto, são insolúveis em água e solução salina; e as gluteninas que, diferente das demais, são insolúveis em solução aquosa neutra, alcoólica ou salina, mas podem ser extraídas por álcalis (OSBORNE, 1924). Essas proteínas do feijão branco apresentam baixa ou nenhuma solubilidade em pH próximo do ponto isoelétrico, em que a repulsão eletrostática é mínima e a interação hidrofóbica entre as superfícies não polares são máximas (RIBEIRO *et al.*, 2009). Alguns estudos mostram que geralmente não há solubilidade no ponto isoelétrico (PI), entretanto, a presença de contra-íons provocam uma mínima solubilidade das proteínas exatamente no PI (TREVINO; SCHOLTZ; PACE, 2008). Guerrero et al. (2002) identificou que a solubilidade

ou insolubilidade das proteínas podem estar relacionados à fatores extrínsecos, como a composição e sequência de aminoácidos, tamanho e conformação das moléculas e com a relação hidrofobicidade/hidrofilicidade.

Os fatores de hidrofobicidade e hidrofilicidade são considerados como os mais importantes que afetam as características de solubilidade, quando esses fatores estão relacionados a camada de superfícies das proteínas, devido ao contato direto da superfície da proteína com a água que está ao seu redor. Ao ser submetido a um processamento térmico, como, por exemplo, o cozimento, pode ocorrer mudanças físico-químicas das proteínas e também em outros componentes do vegetal, no caso o feijão, afetando também o seu valor nutricional (RAMÍREZ-CÁRDENAS, et al., 2008).

Segundo Sathe (2002), a maioria das proteínas de feijão tem ponto isoelétrico (PI) em pH ácido, devido a grandes quantidades de resíduos de ácido glutâmico e aspártico na composição aminoacídica. As proteínas do feijão, albumina e globulinas, apresentam PI na faixa ácida (geralmente entre 4 e 5) e são eficientemente solubilizadas em meio aquoso em pH alcalino (pH de 8,5 a 10 é geralmente eficiente). Ajustando-se o pH de soluções de proteínas solubilizadas para a faixa de pH isoelétrico, consegue-se uma eficiente separação e concentração das principais proteínas.

Ribeiro et al. (2009) realizaram estudos de solubilidade das proteínas do feijão em pHs na faixa de 2-12 (usando HCl 1N ou NaOH 1N), em diferentes períodos de armazenamento (controle, 30 e 60 dias). Os autores observaram menor solubilidade em pH 4 e 5, sendo esses valores próximos ao ponto isoelétrico das proteínas, onde a repulsão eletrostática e a hidratação iônica são mínimas e a interação hidrofóbica entre as superfícies não polares é máxima.

## **2.5 Cromatografia**

A cromatografia é um dos procedimentos mais utilizados para purificação de proteínas. Esse processo pode ser compreendido, basicamente, como um sistema que possui uma fase estacionária e uma fase móvel, e tem como princípio de separação baseada na diferença de interação dos componentes da mistura (fase móvel) com a fase estacionária.

Além da divisão entre fases, a cromatografia pode apresentar resoluções alta e baixas. Técnicas como precipitação possuem baixa resolução ao contrário das técnicas cromatográficas que possuem alta resolução. Tratando-se de proteínas de fontes vegetais, o conhecimento da composição aminoacídica faz-se de grande importância ao traçar estratégias para extração e purificação de proteínas, visto que as dificuldades mais comuns são devido a constituição de não-proteicos com baixa massa molecular (3 kDa), como compostos polifenólicos e seus derivados (JERVIS.; PIERPOINT, 1989).

Pereira et al. (2010) avaliaram diferentes métodos para precipitação do inibidor de  $\alpha$ -amilase. Puderam destacar que a precipitação salina numa concentração de 50% de sulfato de amônia (COELHO; SILVA, 2000) apresentou melhor resultado. Tais processos são utilizados como etapa preliminar para purificação da proteína inibidora de  $\alpha$ -amilase em colunas cromatográficas.

Existem técnicas que podem ser utilizadas em conjunto para que seja obtido um grau de pureza mais relevante das frações proteicas. A junção da solubilização salina ácida com métodos cromatográficos como troca iônica (SANTI-GADELHA et al., 2006) mostram-se excelentes para o fracionamento das proteínas globulares presentes no feijão (TANG; SUN, 2011a). Os autores realizaram estudos sobre a solubilização salina ácida do feijão vermelho (*Phaseolus angularis*). O isolado foi fracionado através da cromatografia de troca aniônica, usando tampão fosfato 50 mM pH 7,0 com gradiente de 0-0,5 M NaCl e sob vazão de 2,5 mL.min<sup>-1</sup>. A avaliação das frações foi feita por eletroforese e constatou que uma das frações da globulina (vicilina 7S) predominava sobre as demais proteínas presentes nas frações e sua pureza nas frações coletadas variava de 89,8% a 92,8%.

Estudos realizados por Hassas-Roudari (2011) a partir de metodologias de purificação para obtenção de proteínas isoladas, realizando tratamentos com etanol, cromatografia por exclusão molecular e cromatografia de troca iônica, destacaram que o tratamento feito a partir do etanol levou a eliminação de constituintes não proteicos do conteúdo total presente no extrato. Os extratos tratados com etanol demonstraram serem mais vantajosos quando comparado aos extratos que não passam por esse tratamento, isso porque apresentaram maior teor de proteínas e continuaram indicando a presença de ISP no extrato, fato esse observado pela análise em SDS-PAGE.

O método cromatográfico utilizado dependerá da biomolécula a ser adsorvida, das suas frações e massa molecular. Esta técnica possui especificidade que garante alto rendimento e adsorvidade. Para amenizar as interferências encontradas em alguns leitos cromatográficos, em especial a transferência de massa, estudos são feitos sobre criogel de poliacrilamida, leitos que possibilitam a mudança da matriz polimérica a depender da biomolécula e do tipo de cromatografia a ser utilizada, seja ela cromatografia de afinidade (SUN et al, 2007), troca iônica (SANTI-GADELHA et al., 2006) ou hidrofóbica (GONÇALVES et al., 2016).

## **2.6 Cromatografia de troca iônica**

A cromatografia por troca iônica, se baseia na separação de biomoléculas ionizáveis de acordo com sua carga elétrica superficial e é um método amplamente empregado na separação e purificação de aminoácidos, peptídeos e proteínas (YAMAMOTO et al., 1988), fazendo o

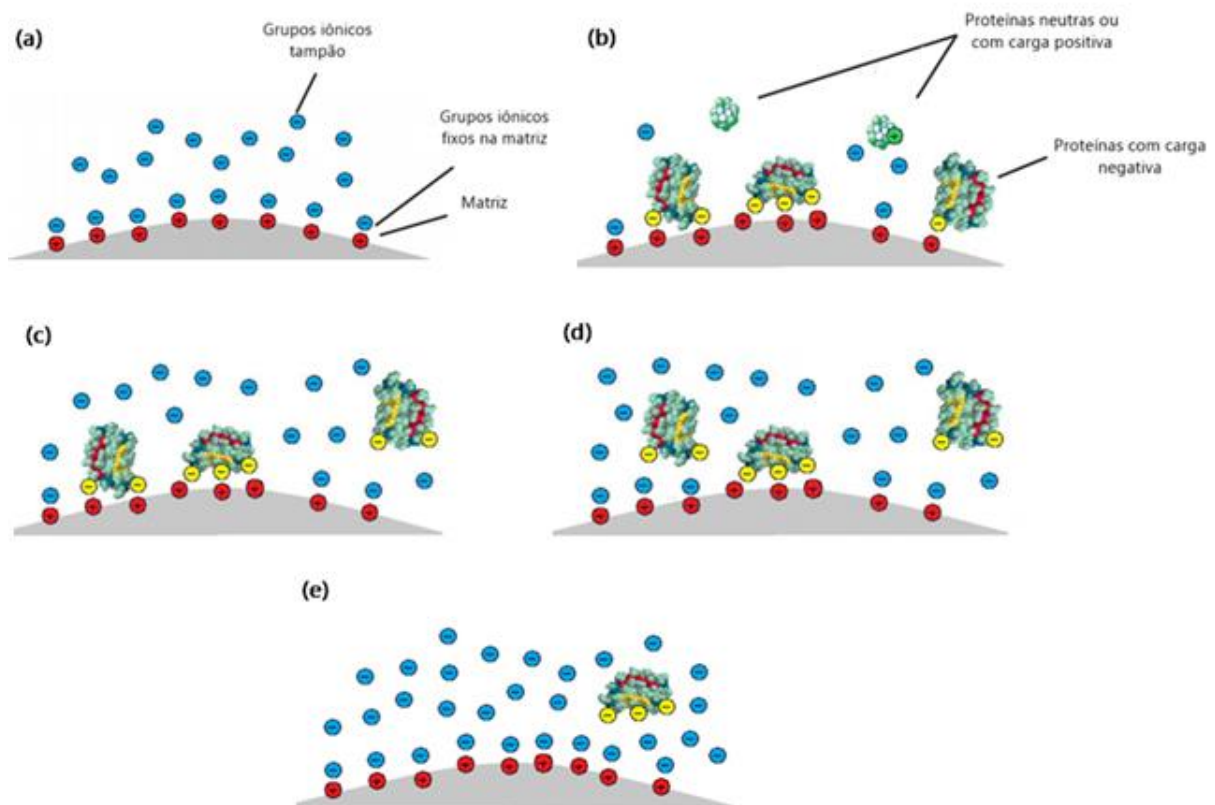
reconhecimento entre o ligante e uma dada proteína, promovendo uma redução das interações não específicas, e também proporciona o aumento do rendimento operacional e elimina facilmente contaminantes indesejáveis. A técnica apresenta boa eficiência, alta resolução, é eficiente mesmo usando extratos bastante diluídos, tornando a purificação em um único passo possível (CUMMINS et al., 2016) e, ainda é capaz de realizar separações mesmo em condições não desnaturantes (ANDERSEN et al., 2004).

Por ser um mecanismo de alta versatilidade, diverso e adequado para purificação de proteínas obtendo purificações com alta resolução e também como papel importante para produção de proteínas de caráter industrial o método de cromatografia de troca iônica é considerado como a técnica mais popular dentre as demais técnicas cromatográficas existentes. Quando se deseja a obtenção de proteínas como por exemplo proteínas nativas, esse método é ideal pois as condições para que haja a separação estão relacionadas às faixas fisiológicas de sal e pH (REITER, 2019).

O princípio da técnica da cromatografia de troca iônica se baseia-se na separação de biomoléculas que são ionizáveis sempre com relação a carga elétrica superficial. Neste processo, as interações eletrostáticas que ocorrem entre o soluto a ser separado e a superfície da matriz cromatográfica, recebem a denominação de adsorção (BOBLETER e BONN, 2011; DAMODARAN e PARKIN, 2019). Fekete et al., (2015) relata que a cromatografia de troca iônica (CTI) é historicamente uma técnica que vem sendo amplamente utilizada para estudos de detalhamento de proteínas, principalmente para proteínas terapêuticas. Além de ter capacidade de fazer a caracterização detalhada, essa técnica tem sido referência e possui grande potencial para análise qualitativa e quantitativa da heterogeneidade de cargas. Percebe-se ainda que existe várias aplicações da cromatografia de troca iônica principalmente nas indústrias farmacêuticas, obtendo diversos tipos de produtos, verificando assim o potencial da CTI na caracterização de variantes de cargas.

Na Figura 1 é possível observar a ilustração de um processo de cromatografia de troca iônica a fim de obter a separação de uma mistura de proteínas. Na ilustração (a) é possível observar a presença da matriz, dos grupos iônicos fixos na matriz e dos grupos iônicos no tampão, onde ocorre a neutralização dos radicais iônicos da matriz, devido à presença de íons em uma solução aquosa tamponada e que apresenta baixa força iônica. Já em (b) notamos a presença de proteínas neutras ou com cargas positivas mais acima na figura e proteínas com cargas negativas mais abaixo. Neste processo, ocorre o deslocamento do soluto (proteínas com cargas superficiais, contra os íons e assim ocorre a interação com os grupos iônicos da matriz, através das interações eletrostáticas. A partir daí, as proteínas que apresentam cargas iguais aos contra íons, serão retidas na matriz, já as proteínas que tiverem cargas diferentes serão eluídas na fase móvel. Posteriormente, utilizando uma solução aquosa tamponada de força iônica baixa, ocorrerá uma etapa de lavagem na matriz com a finalidade de remover todos aqueles componentes que não foram adsorvidos. Em (c), (d) e (e) ocorre um processo denominado eluição, onde acontece o aumento da força iônica da fase móvel, onde faz com que as interações entre

contra íons e os radicais iônicos do adsorvente se tornem preferenciais, isso ocorre ao mesmo tempo em que as proteínas adsorvidas na matriz se deslocam para fase móvel e conseqüentemente são eluídas da coluna cromatográfica. Ao final, a fim de preparar a coluna para um novo processo de adsorção por cromatografia de troca iônica é feito uma lavagem na coluna, com uma solução tampão de força iônica baixa (BOBLETER e BONN, 2011).



**Figura 1:** Etapas de separação de proteínas utilizando a técnica de cromatografia de troca iônica. Fonte: Adaptado de Acikara (2016).

Cavalcanti, (2010) fez a recuperação de proteínas do soro de queijo “tipo coalho” por cromatografia de troca iônica, utilizando três diferentes resinas como leite e obteve resultados expressivos de adsorção, mas ainda assim percebeu que a presença dos sais minerais do soro de leite ocasionou uma interferência na adsorção por troca iônica, por haver uma competição com os sítios ativos das resinas por ambos (sais minerais e proteínas) utilizadas por ele em seu trabalho.

## 2.7 Criogel: síntese, estrutura e aplicações

Criogéis são matrizes tridimensionais de hidrogel mega poroso que em estado semicongelados são sintetizados em sítios de radicais livres polimerizados utilizando um sistema iniciador/ativado, por

foto ou por feixes de elétrons. Os criogéis apresentam como características: aspecto brilhante, tamanhos de poros grandes chegando até aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  e caminhos de difusão curta, boa biocompatibilidade, flexibilidade e uma resistência mecânica alta que se torna indispensável para o processo de biosseparação de purificação (ANDAÇ et al., 2016).

Segundo a literatura, o criogel é uma tecnologia de aproximadamente 4 a 5 décadas, porém na década recente, eles apresentaram uma nova plataforma translacional para o desenvolvimento de camadas porosas interconectadas e são comumente usados em vários setores industriais. Atualmente vem sendo usado amplamente para aplicações de separação de células, captura e purificação moleculares utilizando técnicas cromatográficas, remediação ambiental, dentre outros (SHIEKH et al., 2020).

Os leitos fixos tradicionais apresentam limitações em relação à sua capacidade e produtividade, visto que grandes conjuntos biomoleculares, matérias-primas altamente concentradas, fluidos viscosos ou contendo partículas desafiam os limites cromatográficos. Levando em consideração estas limitações, as colunas monolíticas supermacroporosas fizeram-se necessárias para acrescentar o estudo sobre separação de biomoléculas (GONÇALVES et al., 2016; MACHADO et al., 2015).

Um monólito é considerado como uma fase estacionária de corpo único, podendo este ser inserido em uma coluna cromatográfica (GUIOCHON, 2007). Por conter uma estrutura porosa, os monólitos é uma tecnologia muito útil na área de bioseparação. A estrutura macroporosa e a diferença de diâmetro destes poros, o fluxo através dos poros são puramente convectivos, além de ter resistência a transferência de massa baixa (GONÇALVES et al., 2016), tornando os monólitos uma fase estacionária muito atrativa para cromatografia, principalmente no processamento de grandes biomoléculas como as proteínas.

Estes monólitos poliméricos podem ser formados a partir de qualquer precursor de formação de gel (PLIEVA et al., 2004), como exemplo os géis de agarose, amido, gelatina, em que a rede é mantida unida por meio de interações não-covalentes na forma de ligações físicas (dependente da distância e da carga elétrica dos íons), estes géis são amplamente utilizados em técnicas cromatográficas ou como matrizes de eletroforese (LOZINSKY et al., 2002). Entre os monólitos poliméricos utilizados como colunas cromatográficas, um que apresenta destaque é o criogel de poli(acrilamida), obtido da polimerização de moléculas de acrilamida (Aam) com o agente formador de ligações cruzadas N, N'-metileno-bis-acrilamida (BAam), adicionados ou não de outros monômeros (como o alil-glicidil éter, AGE). A mistura consiste em duas partes principais: os cristais de gelo e uma microfase líquida não congelada entre os cristais de gelo. A reação química ocorre nesta microfase líquida não congelada. Esta reação ocorre sob condições de congelamento moderado ( $-10^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ ), pela técnica conhecida como criogeificação (PLIEVA et al., 2004). O diâmetro dos poros está diretamente relacionado com o rearranjo dos monômeros em conjunto com a taxa de congelamento da

matriz, uma vez que taxas mais lentas podem resultar em poros maiores com interconectividade aumentada. Contrapartida, as taxas de congelamento mais rápidas produzem criogeis mecanicamente mais fracos e com baixo nível de interconectividade (HIXON; LU; SELL, 2017).

A reação de polimerização ocorre nas regiões monoméricas concentradas com congeladas formando um gel polimérico, enquanto cristais de gelo formados atuam como agentes porogênicos (agente formador de poros) (LOZINSKY et al., 2002; GUN'KO et al., 2013). Os criogeis são produzidos a partir de misturas de monômeros, agentes formadores de poros e catalizadores de reação, que são polimerizados em ambiente natural e revertidos em moldes. No final de um período de criogelificação adequado, o criogel é levado à temperatura ambiente. Após o descongelamento dos cristais de gelo, obtém-se uma matriz contendo uma rede contínua de polímeros macroporosos interconectados (HIXON; LU; SELL, 2017).

A imensa variedade de combinações de monômeros e reagentes modificadores da superfície permite que os monólitos poliméricos se adequem há muitos tipos de separação (GUIOCHON et al., 2007). A superfície do monólito pode ser modificada quimicamente a fim de se introduzir funcionalidades, dependendo da aplicação a que se destina. Essa modificação pode ser obtida pela copolimerização de monômeros funcionais (LI et al., 2009), ou imobilização de monômeros funcionais na superfície após a polimerização (YAO et al., 2007).

Na biotecnologia e na bicromatografia preferencialmente são utilizados criogeis macroporosos, sendo hidrogéis que são sintetizados sob o ponto de congelamento do solvente, isso devido apresentar características como o caminho de difusão curta, filmes finos de superfície, tolerabilidade de transferência por condução e baixa contrapressão. Devido a presença de uma estrutura porosa pode-se realizar estudos/processos utilizando taxas de fluxos mais altas ainda na fase móvel, mesmo sendo altamente viscosas. Estima-se que os criogeis de superfície têm cavidades maiores porque possuem uma sequência do monômero em torno das moléculas do analito de estudo e, conseqüentemente, tem uma polimerização controlada (EROL et al., 2016).

Visto todas as vantagens apresentadas sobre as colunas monolíticas macroporosas, pode-se destacar que os criogeis são de grande importância para a indústria de alimentos e farmacêutica por possuírem várias aplicações, exemplo disso temos a imobilização de células, biomoléculas, biorreatores e outros (HIXON; LU; SELL, 2017), processos cromatográficos na purificação de biomoléculas (GONÇALVES et al., 2016; MACHADO et al., 2015). Além disso, estas estruturas apresentam versatilidade, podendo ser produzidas na forma de coluna, discos ou membrana, e quando comparadas às colunas cromatográficas tradicionais podem apresentar baixo custo (LOZINSKY et al., 2002). Entretanto, não há estudos na literatura sobre o uso de criogeis como



monólito cromatográfico para a separação de proteína do feijão branco, sendo então uma alternativa promissora para purificação de proteína vegetal a partir do método estabelecido.

## **CONCLUSÃO**

A aplicação de faseolamina nas indústrias alimentícias e farmacêuticas tem se difundido devido à sua capacidade como um anti-hiperglicemiante. Entretanto, a obtenção dessa proteína com alto grau de pureza e baixo custo tem sido um desafio, necessitando assim, de um desenvolvimento de materiais e técnicas eficientes que reduzam as etapas do processo, e consequentemente os custos envolvidos. Diante disso, o emprego de matrizes cromatográficas como os criogéis de poliacrilamida supermacroporosos tem sido uma alternativa de estudo muito promissora, pelo fato desse material possuir baixo custo, alta porosidade, alta resistência mecânica e baixa resistência ao fluxo, possibilitando a purificação de proteínas a partir de extratos brutos e viscosos como o feijão branco, principal fonte de faseolamina. Além disso, esta matriz pode ser funcionalizada com polietilenoimina, um ligante que possui baixo custo, alta estabilidade e biocompatibilidade. Criogéis modificados desta forma podem ser empregados na cromatografia de troca iônica, uma técnica cromatográfica que tem ganhado espaço em escala laboratorial e industrial.

## REFERÊNCIAS

- ACIKARA, O. B. Ion-Exchange Chromatography and Its Applications. **Intech**, v. 1, p. 31-58, 2016.
- ANDAÇ, Müge; GALAEV, Igor Yu; DENIZLI, Adil. Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification. **Journal of Chromatography B**, v. 1021, p. 69-80, 2016.
- ANDERSEN, Thomas et al. Isoelectric point separation of proteins by capillary pH-gradient ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 2, p. 217-226, 2004.
- ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução de Diretoria Colegiada-RDC N° 14 de 31 de março de 2010. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/rdc0014\\_31\\_03\\_2010.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/rdc0014_31_03_2010.pdf)>. Acesso em : 28 de fevereiro de 2020.
- ARBO, Marcelo Dutra et al. Presence of p-syneprine in teas commercialized in Porto Alegre (RS/Brazil). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 273-278, 2009.
- BARRETT, Marilyn L.; UDANI, Jay K. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. **Nutrition journal**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2011.
- BOLETI, Ana Paula de A. et al. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2653-2658, 2007.
- BOBLETER, O.; BONN, G. Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods. **GE Healthcare**, p. 1187-1242, 2011.
- CAVALCANTI, Jorge dos Santos. Recuperação e purificação de proteínas do soro de queijo tipo coalho usando cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica em leite na forma expandida. 2010. 149 f. **Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, Natal, 2010.
- CHAGAS, Eliana P.; SANTORO, Luiz G. Globulin and albumin proteins in dehulled seeds of three *Phaseolus vulgaris* cultivars. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 51, p. 17-26, 1997.
- COELHO, Patrizia Mello. Avaliação da segurança da farinha de feijão branco comercial em modelo murino. 2018. 28 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade

Federal de Viçosa, Viçosa. 2018.

COELHO, Luana CBB; DA SILVA, Maria BR. Simple method to purify milligram quantities of the galactose - specific lectin from the leaves of Bauhinia monandra. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 11, n. 5, p. 295-300, 2000.

CHEL-GUERRERO, L. et al. Functional properties of flours and protein isolates from Phaseolus lunatus and Canavalia ensiformis seeds. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 50, n. 3, p. 584-591, 2002.

CINTRA, P. Faseolamina uma Possibilidade de Tratamento para a Obesidade. **Interbio**, v. 8, p. 3-4, 2014.

CUMMINS, P. M.; ROCHFORT, K. D.; O'CONNOR, B. F. Protein chromatography: **Ion exchange chromatography: basic principles and application**. New York:ed. 2,HUMANA PRESS, 2016.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L. **Química de alimentos de Fennema**. Artmed editora, 2018.

DURANTI, Marcello; GIUS, Cristina. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, v. 53, n. 1-3, p. 31-45, 1997.

DURIGAN, Jose Fernando; SGARBIERI, Valdemiro Carlos; BULISANI, Eduardo Antonio. Protein value of dry bean cultivars: factors interfering with biological utilization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 694-698, 1987.

EROL, Kadir et al. Polyethyleneimine assisted-two-step polymerization to develop surface imprinted cryogels for lysozyme purification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 567-576, 2016.

FEKETE, Szabolcs et al. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 113, p. 43-55, 2015.

GAD, Mohamed Z. et al. Biochemical study of the anti-diabetic action of the Egyptian plants Fenugreek and Balanites. **Molecular and cellular Biochemistry**, v. 281, p. 173-183, 2006.

- GONÇALVES, Gabriel Ramos Ferreira et al. Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars. **Journal of Chromatography B**, v. 1033, p. 406-412, 2016.
- GUIOCHON, Georges. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, n. 1-2, p. 101-168, 2007.
- GUN'KO, Vladimir M.; SAVINA, Irina N.; MIKHALOVSKY, Sergey V. Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation. **Advances in colloid and interface science**, v. 187, p. 1-46, 2013.
- HASSAS-ROUDSARI, Majid. **Extraction, purification and study of mechanism of action of apoplastic ice structuring proteins from cold acclimated winter wheat leaves**. 2011. Tese de Doutorado. University of Guelph.
- HIXON, Katherine R.; LU, Tracy; SELL, Scott A. A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications. **Acta biomaterialia**, v. 62, p. 29-41, 2017.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF | IBGE**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/trabalho/9050-pesquisa-de-orcamentos-familiares.html?=&t=o-que-e>>. Acesso em 22 de janeiro de 2023.
- IRSHAD, Mohammad; SHARMA, Chandra B. Purification and properties of an  $\alpha$ -amylase protein-inhibitor from *Arachis hypogaea* seeds. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 659, n. 2, p. 326-333, 1981.
- JERVIS, L.; PIERPOINT, W. S. Purification technologies for plant proteins. **Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2-3, p. 161-198, 1989.
- KAN, Lijiao et al. Nutrients, phytochemicals and antioxidant activities of 26 kidney bean cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 467-477, 2017.
- KAN, Lijiao et al. Nutrients, phytochemicals and antioxidant activities of 26 kidney bean cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 467-477, 2017.
- LI, Yun et al. Preparation of polymeric monoliths by copolymerization of acrylate monomers with amine functionalities for anion-exchange capillary liquid chromatography of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 29, p. 5525-5532, 2009.

- LOZINSKY, Vladimir I. et al. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, p. 163-188, 2001.
- MACHADO, Ana Paula F. et al. Adsorptive behavior of  $\alpha$ -lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolithic column. **Fluid Phase Equilibria**, v. 401, p. 64-69, 2015.
- MARSHALL, J. JOHN; LAUDA, CARMEN M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 20, p. 8030-8037, 1975.
- MESQUITA, Fabrício Rivelli et al. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1114-1121, 2007.
- MICHELI, Laura et al. *Phaseolus vulgaris* L. Extract: alpha-amylase inhibition against metabolic syndrome in mice. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1778, 2019.
- MONTOYA, Carlos A. et al. Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 443-449, 2010.
- NÖRNBERG, Marcele Leal; STORCK, Cátia Regina. Potencial nutricional de farinhas de feijão branco e aplicação em produto de panificação Nutritional potential of flour white bean and application of bakery product. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 2, p. 10255-10269, 2022.
- OLIVEIRA, Renato JS et al. Phaseolamin treatment prevents oxidative stress and collagen deposition in the hearts of streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 11, n. 2, p. 110-117, 2014.
- OSBORNE, Thomas Burr. The vegetable proteins. **Longmans, Green and Company**, 1924.
- PEREIRA, LUCIANA LOPES SILVA. Estudo comparativo entre faseolamina comercial e farinha de feijão como perspectiva ao tratamento da obesidade e do diabetes mellitus tipo 2. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) –Universidade Federal de Lavras, Lavras, 72 f. 2008.
- PLIEVA, Fatima M. et al. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of separation science**, v. 27, n. 10 - 11, p. 828-836, 2004.
- PLIEVA, Fatima M. et al. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide

based matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 129-137, 2004.

RAMÍREZ-CÁRDENASI, Lucía; LEONEL, Alda Jusceline; COSTA, Neuza Maria Brunoro. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 200-213, 2008.

REITER, Katrin et al. Separation of virus-like particles and extracellular vesicles by flow-through and heparin affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1588, p. 77-84, 2019.

RIBEIRO, H.J.S de S. et al. Characterization of protein concentrates from new and aged dry black common beans, Iapar 44 cultivar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 571-580, 2009.

SANTI-GADELHA, Tatiane et al. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 4, p. 1050-1055, 2006.

SATHE, S. K. Dry bean protein functionality. **Critical reviews in biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 175-223, 2002.

SHI, Zhenxing et al. Natural Extracts from White Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) Inhibit 3T3-L1 Adipocytes Differentiation. **Applied Sciences**, v. 11, n. 1, p. 167, 2021.

SHIEKH, Parvaiz Ahmad et al. Designing cryogels through cryostructuring of polymeric matrices for biomedical applications. **European Polymer Journal**, v. 144, p. 110234, 2021.

SILVA, Luiz Fernando Miranda da; FERREIRA, Karla Silva. Segurança alimentar de suplementos comercializados no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 20, n. 5, p. 374-378, 2014.

SUN, S. M.; HALL, Timothy C. Solubility characteristics of globulins from *Phaseolus* seeds in regard to their isolation and characterization. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 23, n. 2, p. 184-189, 1975.

TANG, C.; SUN, X. Structure–physicochemical function relationships of 7S globulins (vicilins) from red bean (*Phaseolus angularis*) with different polypeptide constituents. v. 25, p. 536-544, 2011.

TREVINO, S. R.; SCHOLTZ, J. M.; PACE, C. N. Measuring and Increasing Protein Solubility. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 10, p. 4155–4166, 2008.

UDANI, Jay K. et al. Lowering the glycemic index of white bread using a white bean extract. **Nutrition Journal**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2009.

YAO, Kejian et al. In-situ graft-polymerization preparation of cation-exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1-2, p. 246-251, 2007.

YIN, Shou-Wei et al. Functional properties and in vitro trypsin digestibility of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate: effect of high-pressure treatment. **Food chemistry**, v. 110, n. 4, p. 938-945, 2008.

ZHU, Zongjian; JIANG, Weiqin; THOMPSON, Henry J. Edible dry bean consumption (*Phaseolus vulgaris* L.) modulates cardiovascular risk factors and diet-induced obesity in rats and mice. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. S1, p. S66-S73, 2012.

**SEGUNDA PARTE: ARTIGO****Purificação de faseolamina de feijão branco (*pasheolus vulgaris l.*) por cromatografia de troca iônica em coluna de criogel**

**Autores:** Kennedy Borges Oliveira<sup>1</sup>, Katia Silva Maciel<sup>2</sup>, Ana Cristina Feitas de Oliveira Meira<sup>1</sup>, Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo<sup>1</sup>, Luis Antônio Minim<sup>2</sup>, Renata Cristina Ferreira Bonomo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais 37200-900, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Salvador, Bahia 45031-900, Brasil.

(Versão Preliminar)

**A ser submetida na revista:** Process Biochemistry



## **Purificação de faseolamina de feijão branco (*Phaseolus vulgaris* L.) por cromatografia de troca iônica em coluna de criogel**

### **Resumo**

Foi desenvolvido um criogel de poliacrilamida funcionalizado com polietilimina (PEI) para ser utilizado como um trocador aniônico em estudos de adsorção de faseolamina em diferentes condições de pH (7,2, 7,8 e 8,4) e concentração de sal [Tris-HCl] (20 mM, 60 mM e 100 mM). O criogel funcionalizado com PEI (cryo-PEI) apresentou poros interconectados, estrutura uniforme e esponjosa, coloração esbranquiçada, baixa resistência ao fluxo e permeabilidade ( $K_w$ ) de  $5,0 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ . Os resultados de dispersão axial ( $D_{ax}$ ) do cryo-PEI variaram de  $0,5 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$  a  $6,5 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ . A melhor condição experimental para a captura da faseolamina foi obtida em pH 7,8 e concentração de sal de 100 mM de Tris-HCl, sendo obtido um rendimento de adsorção de 149,706% e um fator de purificação de 10,838. Estes resultados demonstram que o cryo-PEI e o protocolo desenvolvido para a purificação de faseolamina por cromatografia de troca iônica foram bem sucedidos.

**Palavras-chaves:** Troca iônica. Criogel. Feijão Branco. Proteína. Captura

## Introdução

A maior parte da dieta humana é constituída por carboidratos que, cuja ingestão em excesso, acarreta aumento de peso corporal, tendo como consequência problemas como hipertensão, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, dentre outros. O sobrepeso e a obesidade vêm aumentando rapidamente no mundo, sendo considerados como um problema de saúde pública, associado à redução da expectativa de vida. Neste sentido, a introdução de estratégias como suplementação alimentar e inserção de fitoquímicos na alimentação têm sido sugeridas para reduzir a ingestão e absorção de carboidratos. Para isso, soluções como a utilização de inibidores de enzimas digestivas como a  $\alpha$ -amilase têm sido empregadas, como também introdução de fibras dietéticas na alimentação (PEDDIO, 2022).

Inibidores de  $\alpha$ -amilases podem ser encontrados em diversas fontes alimentícias como arroz, milho, trigo e feijão. Alguns dos inibidores são considerados inibidores específicos como a glicoproteína faseolamina, uma proteína oligomérica composta por três sub-unidades polipeptídicas com massa molecular entre 43 a 55 kDa. Esta proteína é extraída do feijão comum e do feijão branco e atua principalmente na inibição da enzima  $\alpha$ -amilase humana (MARSHALL, 1975).

O feijão é considerado um alimento que fornece aos animais e seres humanos nutrientes que são considerados essenciais, como carboidratos, proteínas, fibras, vitaminas, ferro, zinco, magnésio, cálcio e antioxidantes (YANG, et al., 2018; NAWAZ, 2020). É uma leguminosa considerada como alimento popular em todo mundo e como principal alimento que fornece proteínas para população de baixa renda, destacando-se como um produto de importância nutricional, econômica e social (MENG, 2020).

A faseolamina é uma glicoproteína importante presente no feijão branco, capaz de bloquear a atividade da enzima digestiva  $\alpha$ -amilase, impedindo o metabolismo e a absorção de carboidratos (STEFANUCCI, 2022). Os primeiros estudos com a faseolamina do feijão branco foram realizados por MARSHALL; LAUDA, (1975). Os autores afirmaram que a faseolamina é uma glicoproteína de massa molar entre 45 e 55 kDa, sendo ela específica para inibição da  $\alpha$ -amilase animal, mas não atua sobre as  $\alpha$ -amilases bacterianas e de plantas. A Faseolamina já pode -ser encontrada no mercado farmacêutico em cápsulas como também em pó e farinha e é bastante indicada para tratamento de obesidade e diabetes, uma vez que ela inibe a digestão do amido, impedindo a absorção de carboidratos devido à atividade de inibição causada através da sua ligação à enzima alfa-amilase (COLAÇO E DEGÁSPARI, 2014; MARQUESI et al 2021).

Diante do papel importante e das funcionalidades da faseolamina, é necessário a aplicação de técnicas para a obtenção dessas proteínas com certo grau de pureza e estabilidade biológica, desde o processo de extração, separação e principalmente nas etapas de purificação. Assim, muitas técnicas de purificação têm sido estudadas e encontra-se um destaque especial para as técnicas cromatográficas, que têm conferido uma maior purificação (SILVEIRA et al., 2009; NAJAFPOUR, 2015; NAM et al., 2016).

A extração e purificação da faseolamina é objeto de estudo desde a década de 1980. Sua separação engloba a precipitação, diálise, tratamento por calor e cromatografia, como exclusão molecular, troca iônica e interações hidrofóbicas (MATA, 2020; LEE et al., 2002; MENG, 2002; TANG; SUN, 2011). Essas técnicas apresentam limitações em seu uso, uma vez que, para obter resultados satisfatórios, faz-se necessário a aplicação de várias etapas no processo.

A cromatografia por troca iônica se baseia na separação de biomoléculas ionizáveis de acordo com sua carga elétrica superficial, e é um método amplamente empregado na separação e purificação de aminoácidos, peptídeos e proteínas devido à sua seletividade única que fornece perfis cromatográficos distintos quando comparado com outros métodos de separação, (como por exemplo, a cromatografia líquida de fase reversa, cromatografia por exclusão, dentre outras) sem desnaturar sua proteína alvo após processo de isolamento. Apresenta boa eficiência mesmo usando extratos bastante diluídos, o que torna possível a purificação em uma única etapa e, ainda, realiza separações sob condições não desnaturantes. Nela ocorre o reconhecimento entre o ligante e uma dada proteína por meio da promoção ou redução de interações eletrostáticas, eliminando facilmente contaminantes indesejáveis e, conseqüentemente, aumentando o rendimento operacional (LOSACCO, 2022)

Adsorventes funcionalizados com polietilenoimina têm atraído a atenção em aplicações para purificações (CHOI, 2016; JEON, 2018; JEON, 2020; HENAO et al., 2020). A quaternização de grupos aminos da polietilenoimina resulta em um trocador aniônio, de tal forma que sua interação com proteínas ocorre através de forças eletrostáticas. Essa técnica tem demonstrado vantagens em termos de simplicidade e eficiência econômica em comparação com outras técnicas devido ao potencial de aumentar a capacidade de troca iônica da fase estacionária, o que resulta em variações consideráveis de seletividade (SHCHUKINA, 2017).

Sendo assim, neste trabalho foi desenvolvido um criogel de troca iônica para purificação da faseolamina a partir do isolado proteico do feijão branco. O isolado proteico foi obtido a partir da solubilização alcalina da farinha do feijão, seguido de diálise e centrifugação. O criogel de troca iônica constituído de polietilenoimina quaternizada (cryo-PEI) foi caracterizado em termos de suas características morfológicas e hidrodinâmicas. O efeito do pH e da força iônica sobre a adsorção da faseolamina no cryo-PEI foi avaliado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Separação e Purificação de Biomoléculas (LSPB) da Universidade Federal de Lavras e no Laboratório de Desenvolvimento de Simulação de Processos (LADESP) da Universidade Federal de Viçosa, campus Viçosa-MG.

### **Materiais**

Os reagentes para a síntese e funcionalização do criogel foram acrilamida (AAM, 98,5%), N, N'-metileno-bis-acrilamida (BAAM, 99%), alil glicidil éter (AGE, 99%), N, NN', N'-tetrametileno-diamina (TEMED), persulfato de amônio (APS), solução de polietilenoimina 50% m/v e  $\alpha$ -amilase de porcina pancreática tipo VI-B (3,4276 U/mg), amido modificado e ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Fosfato de sódio, hidróxido de sódio, ácido fosfórico 85%, sulfato de sódio e fosfato de potássio foram adquiridos da Vetec (São Paulo, BRA). Água ultrapura (Milli-Q System, Millipore Inc., EUA) foi utilizada em todos os experimentos. Os demais reagentes são descritos ao longo da metodologia e foram de grau analítico.

### **Obtenção da farinha desengordurada de feijão branco**

Os grãos de feijão branco foram adquiridos no comércio local, na cidade de Lavras - Minas Gerais, armazenados em sacos de polietileno e conservados em temperatura ambiente, em local seco e arejado até o seu uso.

Para obter a farinha de feijão branco desengordurada foi utilizada a metodologia proposta por Nadal et al., (2011). Os grãos do feijão branco foram descascados e moídos em moinho de facas (Tecnal modelo TE-631/3) para obtenção da farinha. Posteriormente, a farinha foi desengordurada com solvente hexano na proporção 1:6 (m/v) em extrator Soxhlet por 6 h à temperatura de 68,5 °C e em seguida foi seca em estufa a 60 °C durante 24 horas e armazenada em dessecador até o uso.

### **Produção do extrato proteico de feijão branco**

O extrato proteico de feijão branco foi obtido segundo a metodologia adaptada de AJIBOLA et al., 2016 e SUN et al., 1975. Para isto, foi realizado uma solubilização alcalina da farinha desengordurada em tampão fosfato de sódio (50 mM) pH 8,5 na proporção de 1:10 (farinha:tampão fosfato de sódio) sob agitação magnética, por 60 minutos à temperatura

ambiente, seguido de centrifugação a  $11.000\times g$  por 20 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Após a centrifugação foi coletado o sobrenadante e com o precipitado repetiu-se o processo de extração nas seguintes condições: 60 mL de tampão fosfato de sódio, agitação magnética durante 10 minutos e centrifugação ( $11.000\times g$  por 20 minutos,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Em seguida, todo o sobrenadante coletado foi dialisado contra água ultrapura a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 48 horas, utilizando uma membrana de 12 kDa de *cut-off*. Após a etapa de diálise, foi feita uma centrifugação a  $11.000\times g$  por 20 minutos,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi liofilizado em liofilizador Alpha 2-4 LD plus, Martin Christ, Alemanha a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 0,37 mbar. O isolado proteico obtido foi armazenado a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  em recipiente âmbar até seu uso.

### **Síntese dos criogéis**

Os criogéis foram produzidos de acordo com a metodologia proposta por Veríssimo et al. (2017). Uma proporção de 9,86% m/v de monômeros (1,185 g AAm, 0,3175 g BAAm e 1 mL de AGE) foi dissolvida em 25 mL de água deionizada até a solubilização completa. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de APS (27,5 % m/v) e 23,8  $\mu\text{L}$  de TEMED. A solução foi então vertida em coluna de vidro com diâmetro interno de 0,5 cm e altura de 10 cm, vedadas e mantidas em banho ultratermostático (Nova Ética 521 / 3DE, Brasil) contendo etilenoglicol a  $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Os criogéis produzidos foram descongelados em temperatura ambiente e lavados com água deionizada.

### **Funcionalização dos criogéis para adsorção por troca aniônica**

A imobilização do ligante de troca iônica (PEI) no criogel foi realizada explorando a reatividade dos grupos epóxi decorrentes do co-monômero alil glicidil éter (AGE) (Wheatley e Schmidt JR 1999; Altintas et al. 2007; Oliveira et al. 2019). Inicialmente, foi percolado 500 mL de água através da coluna de criogel, a uma vazão de 1 mL/min durante 6 h. Em seguida, 45 mL de solução aquosa de polietilenoimina (1,0 % m/v) foi recirculado na coluna de criogel durante 24 horas, a uma vazão de 0,5 mL/min. Em seguida, o criogel foi lavado com 5 mL de água e a quaternização foi realizada percolando 25 mL de solução aquosa de epicloridrina (6 % v/v) por 6 h, a uma vazão de 0,5 mL/min. Por fim, a solução residual foi removida lavando o criogel com 100 mL de água deionizada, a uma vazão de 1 mL/min.

### **Caracterização dos criogéis**

#### **Permeabilidade ao escoamento**

A permeabilidade ao escoamento foi determinada por meio da relação da queda de pressão hidrostática através da coluna de criogel versus a vazão da fase móvel (0,5 cm/min a 10 cm/min). Para tanto, foi utilizado um cromatógrafo líquido preparativo (ÄKTA Pure 25M, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia) e uma coluna de vidro com diâmetro interno de 0,5 cm e altura de 10 cm. Neste sistema foram obtidos os dados experimentais da queda de pressão hidrostática ( $\Delta P$ ) através do cryo-PEI, em função da vazão volumétrica da fase móvel, que foi constituída de água ultrapura. Os experimentos foram realizados à temperatura de 25 °C, com duas repetições.

A permeabilidade hidráulica ( $K_w$ ) foi calculada com base na lei de Darcy para escoamento em meio poroso (GUIOCHON, 2007) de acordo a Equação 1.

$$\frac{\Delta P_w}{L} = \frac{\mu_w}{K_w} U \quad (01)$$

Onde:  $U$  é a velocidade de escoamento água através da coluna em  $m.s^{-1}$ ,  $\mu_w$  é a viscosidade da água ( $1,00 \times 10^{-3}$  Pa.s),  $L$  é o comprimento da coluna em m e  $\Delta P_w$  é a queda de pressão em MPa.

### **Distribuição dos tempos de residência (DTR) e Dispersão Axial**

A distribuição do tempo de residência (DTR) no cryo-PEI foi determinada em um sistema cromatográfico Äkta pure 25 M (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia), à temperatura ambiente, segundo o método do pulso de um traçador (LEVENSPIEL, 1999). A fase móvel composta por água ultrapura foi bombeada através da coluna monolítica, em diferentes vazões (0,5 a 8 mL.min<sup>-1</sup>), e um pulso de acetona (100  $\mu$ L, 5 % v/v) foi injetado e a absorbância foi monitorada a 280 nm.

Os tempos de retenção e as variâncias para os pulsos observados foram calculados utilizando-se o método dos momentos (FURUSAWA; SUZUKI; SMITH, 1976), de acordo com Equação 2:

$$M_1 = t_r = \frac{\sum_{i=1}^n t_i Abs_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n Abs_i \Delta t_i} \quad (02)$$

Onde:  $M_1$  é o primeiro momento estatístico (s), corrigido considerando-se o volume vazio do equipamento,  $t_r$  é o tempo de retenção (s),  $t_i$  é o tempo (s) em que a  $i$ -ésima observação foi registrada,  $\Delta t_i$  é o intervalo de tempo (s) entre a  $i$ -ésima e a  $(i-1)$ -ésima observação (para  $i \geq 2$ ) e  $Abs_i$  é a absorbância registrada no tempo  $t_i$ .

Além dos tempos de residência ou primeiro momento ( $M_1$ ), foram calculadas também as variâncias ( $\sigma^2$ ) ou segundos momentos estatísticos ( $M_2$ ) de cada pulso, que representa a variância da DTR, centrada no valor do tempo de retenção calculado no primeiro momento, utilizando-se a Equação 3 (FURUSAWA; SUZUKI; SMITH, 1976).

$$M_2 = \sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n t_i^2 Abs_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n Abs_i \Delta t_i} \quad (03)$$

Onde:  $M_2$  é o segundo momento estatístico ( $s^2$ ), corrigido considerando-se o volume vazio do equipamento,  $\sigma^2$  é a variância do pulso observado ( $s^2$ ),  $t_i$  é o tempo (s) em que a  $i$ -ésima observação foi registrada,  $\Delta t_i$  é o intervalo de tempo (s) entre a  $i$ -ésima e a  $(i-1)$ -ésima observação (para  $i \geq 2$ ),  $Abs_i$  é a absorvância registrada no tempo  $t_i$  e  $t_r$  é o tempo de retenção do pulso observado (s).

Os gráficos das curvas de DTR foram plotados na forma normalizada de acordo com a Equação 4 (ZABKA *et al.*, 2006).

$$DTR^* = E_\theta = \frac{C(t)}{\int_0^\infty C(t) dt} = \frac{Abs(t)}{\int_0^\infty Abs(t) dt} \quad (04)$$

Onde:  $DTR^* = E_\theta$  é a função de distribuição de tempo de residência normalizada ( $s^{-1}$ ) e  $Abs$  é a absorvância registrada em função do tempo.

Uma vez determinados  $t_r$  e  $\sigma^2$ , o coeficiente de dispersão axial aparente para cada velocidade de escoamento estudada foi calculado por regressão não-linear, resolvendo-se a Equação 5 (LEVENSPIEL, 1999) utilizando-se a ferramenta *solver* do *software* MS-Excel<sup>®</sup> 2007 (Microsoft, Redmond, EUA).

$$\frac{\sigma_t^2}{t_r^2} = 2 \left( \frac{D_{ax}}{uL} \right) - 2 \left( \frac{D_{ax}}{uL} \right)^2 \left[ 1 - \exp \left( \frac{-uL}{D_{ax}} \right) \right] \quad (05)$$

Onde:  $D_{ax}$  é o coeficiente de dispersão axial, e  $u$  é a velocidade intersticial do fluido através do criogel  $\left( u = \frac{U}{\varepsilon_T} \right)$ .

### Porosidade

A porosidade foi determinada a partir da Equação 6 (FURUSAWA; SUZUKI; SMITH, 1976).

$$t_r = \frac{L}{U} \varepsilon_t \quad (06)$$

Onde:  $\varepsilon_t$  é a porosidade total da coluna,  $t_r$  é o tempo de residência em s,  $L$  é o comprimento da coluna em m, e  $U$  é a velocidade de escoamento da fase móvel em  $m \cdot s^{-1}$ .

### **Altura equivalente dos pratos teóricos (HETP)**

A altura equivalente a um prato teórico (HETP) também foi calculada a partir das curvas DTR através da Equação 7:

$$HETP = L \times \frac{\sigma_t^2}{t_R^2} \quad (07)$$

### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A caracterização morfológica do cryo-PEI foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Uma amostra de cryo-PEI completamente seco foi quebrado próximo a região central e fixada em suporte apropriado (stub) e diretamente metalizado com uma fina camada de ouro. Após metalização a amostra foi levada para análise em um microscópio eletrônico de varredura com aumentos de 200× a 4.000×. As micrografias foram realizadas no Núcleo de Análises de Biomoléculas (NuBioMol) da Universidade Federal de Viçosa.

## **Captura da faseolamina do feijão branco**

### **Delineamento experimental e análises estatísticas**

Um delineamento Delineamento Face Centrada (DFC) com três repetições no ponto central, foi empregado a fim de avaliar o efeito dos fatores pH e concentração de Tris-HCl sobre a purificação da faseolamina do feijão branco (Tabela 1).



**Tabela 1:** Fatores e níveis do delineamento de face centrada.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
pH	7,2	7,8	8,4
[Tris-HCl] (mM)	20	60	100

Os resultados do DFC foram submetidos à análise de regressão a um nível de significância de 5%, e um modelo polinomial quadrático foi ajustado (Equação 08).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + e \quad (08)$$

Onde: Y são as respostas previstas (fator de purificação ou rendimento),  $\beta$  é coeficiente ajustável do modelo.

A adequabilidade do modelo foi determinada pela avaliação da falta de ajuste, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o nível de significância ( $p < 0,05$ ) dos coeficientes da regressão. As superfícies de resposta foram geradas no software SigmaPlot versão 11 (Systat Software, Inc., San Jose, EUA).

### Ensaio de purificação

A purificação da faseolamina do feijão branco foi realizada em um sistema cromatográfico preparativo AKTA Pure 25 (GE Healthcare, Suécia), acoplado de um coletor automático de frações (F9-R, GE Healthcare, Suécia), utilizando uma coluna de 0,5 cm de diâmetro interno e 10 cm de altura preenchida com cryo-PEI. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura e filtradas em membrana de acetato de celulose 0,45  $\mu\text{m}$ .

Inicialmente, a coluna de cryo-PEI foi lavada com 4 volumes de coluna (VC) de uma solução de tampão Tris-HCl (tampão de equilíbrio) a 25 °C, em valores de pH e força iônica variáveis (Tabela 1). Após isto, foi injetado 25 mL da solução do isolado proteico para a adsorção da faseolamina. A coluna foi então lavada com 2 VC do tampão de equilíbrio. A dessorção da faseolamina foi feita subsequentemente com 6 VC do tampão de equilíbrio

adicionado de NaCl (0,6 M). A coluna de cryo-PEI foi regenerada com 6 VC usando o tampão de equilíbrio em valores de pH e força iônica variáveis (Tabela 1). Amostras eluídas da coluna de cryo-PEI foram coletadas em um coletor de frações e foram analisadas quanto à atividade de inibição da  $\alpha$ -amilase, proteínas totais e eletroforese SDS-Page.

### **Quantificação da proteína total**

A quantificação da concentração de proteínas na solução de alimentação de isolado proteico e nas amostras eluídas foi realizada de acordo com a metodologia de Bradford (1976), por meio da leitura da absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro UV-Vis (Biomate 3, Thermo Scientific, USA). Uma curva analítica foi construída utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão, em concentrações de 0,1 mg/mL a 1 mg/mL.

### **Eletroforese SDS-PAGE**

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com metodologia modificada de Evangelho et al. (2017), em géis de empilhamento com 4% (m/v) de poliacrilamida em tampão de empilhamento (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8) e géis de separação com 12% (m/v) de poliacrilamida em tampão (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8).

Alíquotas de 100  $\mu$ L das amostras eluídas foram misturados a 500  $\mu$ L de solução desnaturante (Tris-HCl pH 6,8, 10% SDS, 10% glicerol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,1% azul de bromofenol) e incubados a 90 °C por 10 min, em banho maria. Em seguida, alíquotas de 30  $\mu$ L das amostras desnaturadas foram injetados no gel de separação e a corrida eletroforética foi conduzida sob a voltagem de 100 V durante 3 h. As proteínas fixadas no gel foram coradas com 0,2% (m/v) de azul de Coomassie, solubilizado em uma mistura de 50% de etanol e 12% de ácido acético. A descoloração dos géis foi realizada utilizando uma solução de 50% de etanol e 12% de ácido acético durante 12 h. A massa molecular das frações proteicas foi estimada comparativamente com o marcador de massa molecular SigmaMarker™ (6,5 kDa-200 kDa) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

### **Atividade de inibição da $\alpha$ -amilase**

A atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ IA) da faseolamina foi determinada segundo metodologia modificada de Pueyo et al. (1993). A  $\alpha$ -amilase pancreática de suíno (A3176-1MU, Tipo IV-B, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi solubilizada em tampão succinato de sódio (15 mmol/L NaOH, 20 mmol/L CaCl<sub>2</sub> e 0,5 mol/L NaCl, pH 5,6) e mantida a 8 °C.

Alíquotas de 500 µL da solução α-amilase foram incubadas com 500 µL de amostra eluída do cryo-PEI, em banho-maria a 37 °C por 30 min. Após, foram adicionados 500 µL de solução de amido modificado 1% (40 mM de fosfato de potássio, 50 mM NaCl, pH 6,9) e a reação procedeu a 20°C por 3 min. Após o tempo de reação da etapa anterior, foi adicionado 500 µL do reagente DNS (ácido dinitrosalicílico) (BERNFELD, 1955). Os tubos foram aquecidos a 90°C por 10 min, seguido de resfriamento em água corrente e então, foram acrescidos 3,5 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm. Uma curva de calibração foi construída com maltose em concentrações variáveis de 0,2 mg/mL a 2 mg/mL. As amostras branco e controle foram tratadas com os mesmos procedimentos, porém, sem a presença do inibidor e da enzima. Uma unidade de atividade inibitória (U) foi definida como a quantidade de inibidor de α-amilase que inibiu completamente a atividade de uma unidade (U) da enzima (PUEYO; HUNT; CHRISPEELS, 1993).

### **Rendimento e Fator de Purificação**

O rendimento de adsorção (R %) e o fator de purificação (PF) da faseolamina foram calculados pelas Equações 09 e 10:

$$R = \frac{A_{Te}}{A_{Ti}} \quad (09)$$

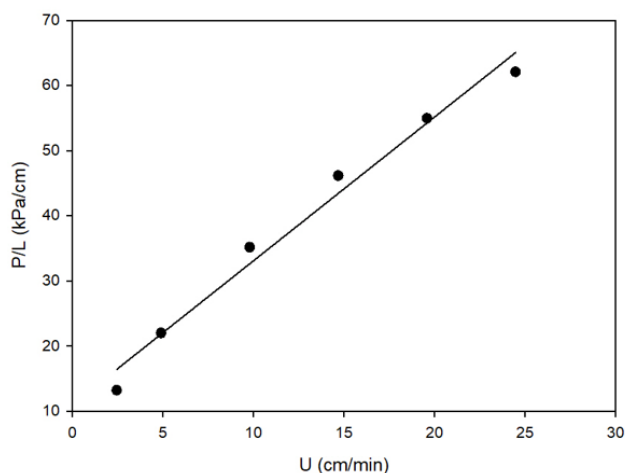
$$FP = \frac{A_{Se}}{A_{Si}} \quad (10)$$

onde  $A_{Te}$  é a atividade inibitória (U/ml) recuperada no eluído,  $A_{Ti}$  é a atividade inibitória (U/ml) do isolado proteico injetado na coluna de cryo-PEI,  $A_{Se}$  é o atividade inibitória específica (U/mg) das amostras eluídas e  $A_{Si}$  é a atividade inibitória específica (U/mg) do isolado proteico injetado.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Caracterização do cryo-PEI**

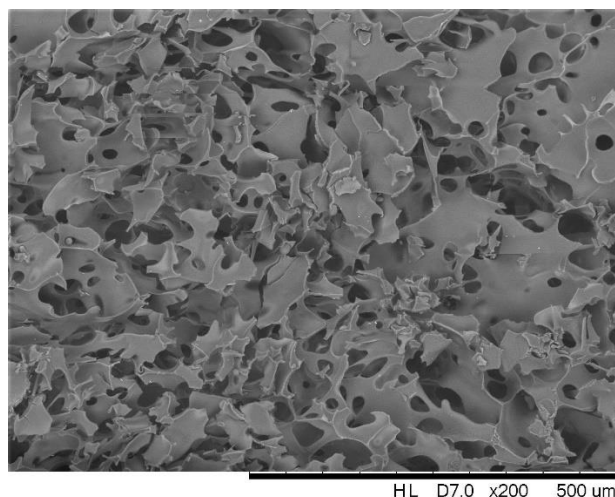
A permeabilidade hidráulica está relacionada com a resistência ao fluxo através a coluna de criogel. Os dados experimentais para resistência ao fluxo são mostrados em Fig. 01.



**Figura 1:** Dados experimentais de queda de pressão em diferentes velocidades de fluxo de água (●) e equação ajustada para determinar a permeabilidade.

O resultado obtido para a permeabilidade ao escoamento no cryo-PEI foi de  $5,03 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ , indicando que a resistência ao fluxo é baixa. Esse resultado foi próximo a outros encontrados para criogéis de poli(acrilamida) por Mol et al. (2017) e Fontan et al. (2017). A baixa resistência ao fluxo confirma que o cryo-PEI apresentou estrutura altamente porosa, mesmo após a funcionalização química da superfície do criogel com a enxertia da polietilenoimina, permitindo que as matrizes obtidas neste trabalho possam ser aplicadas na purificação de extratos brutos não clarificados.

Na Fig. 02 é possível observar uma estrutura altamente porosa, com poros interconectados que permitem a passagem de soluções particuladas, não clarificadas, fluidos viscosos fazendo com que a transferência de massa seja facilitada, contribuindo para o processo de adsorção e assim resultando na eficiência de separação (MOL et al. 2017). Os criogéis funcionalizados com PEI seguido de quaternização apresentaram uma estrutura uniforme, esponjosa e de coloração esbranquiçada.



**Figura 2:** Micrografia do Criogel a 500x

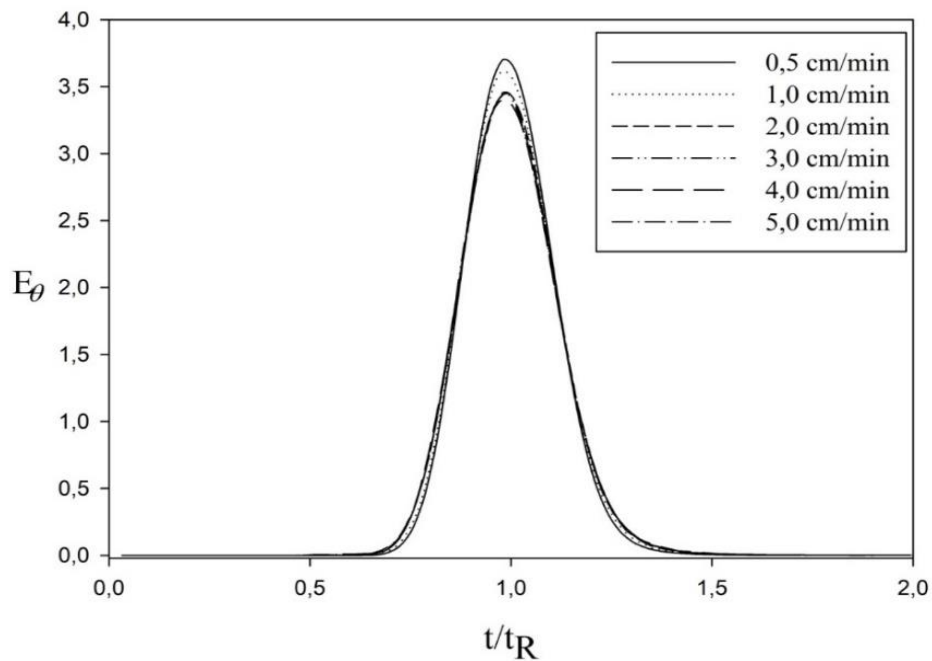
### **Distribuição dos tempos de residência (DTR) e Dispersão Axial ( $D_{AX}$ )**

A curva de distribuição de um traçador para diferentes condições avaliadas, pode ser observada na Fig. 03. Foi possível observar que a DTR não sofreu variação nas diferentes velocidades de fluxo empregada (figura 3). Os picos simétricos, observados nos resultados, representam um perfil de fluxo tipo pistão, indicando assim uma baixa dispersão. Através das curvas de DTR foi calculado o tempo médio de residência e a variância, utilizando o método de momentos, no qual foi determinado também a Dispersão Axial ( $D_{AX}$ ) e a Altura Equivalente de Pratos Teóricos (HETP). Com o aumento da velocidade do fluxo da fase móvel houve um aumento da  $D_{AX}$ , e isso pode ser observado através da Fig. 04. A porosidade foi determinada por uma regressão linear (Eq. 05) e o resultado foi de 0,815. Em outros estudos avaliando criogéis macroporosos foi possível observar que obtiveram também valores próximos aos encontrados neste trabalho, sendo que estão dentro da faixa de valores encontrados por (PAN et al., 2015). De Souza et al. (2023) encontraram resultado para porosidade de 0,89 também utilizando cryo-PEI quaternizado com epcloridrina, valor próximo ao encontrado neste trabalho.

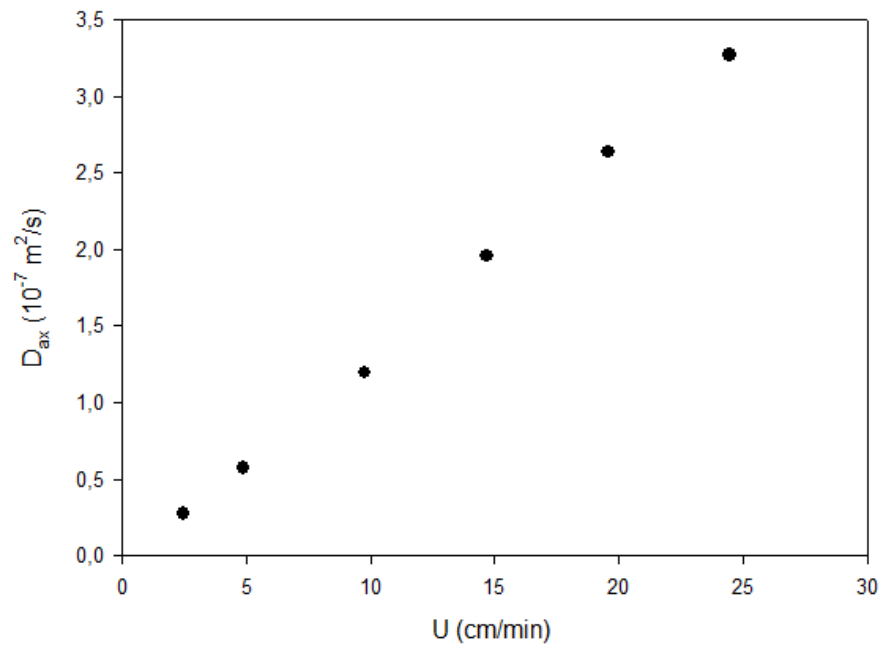
O desempenho da coluna pode ser verificado pela  $D_{AX}$ , assim como também pode ser verificado através da HETP. Na figura. 6 pode-se verificar que não houve variação da HETP em função da velocidade do fluxo, sendo assim é possível dizer que a transferência de massa ocorre de forma predominante por convecção, resultado esse semelhante ao encontrado por Neves et al. (2020) e Maciel et al. (2023).

Os valores obtidos neste trabalho de altura equivalente a um prato teórico (HEPT) estão na faixa de 0,10 - 0,13 cm, que foram valores inferiores aos encontrados por Carvalho et al., 2016 e De Souza et al., 2023. De modo geral, os valores apresentados neste trabalho são

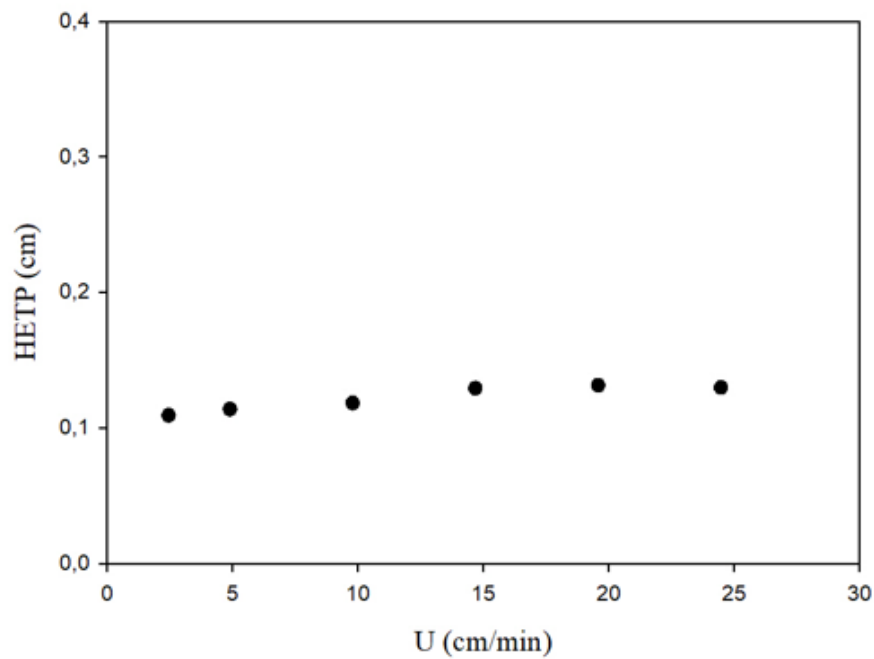
considerados bons, indicando uma transferência de massa facilitada e alta capacidade dinâmica da coluna, o que significa que a coluna comporta um alto número de pratos teóricos e consequentemente tem uma boa resolução (MOL, 2019). Os resultados de dispersão axial ( $D_{AX}$ ) do cryo-PEI aumentaram de acordo com o aumento da velocidade do fluxo e variaram de  $2,75 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$  a  $3,27 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ . Esses valores estão dentro da faixa obtida em experimentos com criogéis macroporosos (MACIEL et al., 2023 e PAN et al., 2015).



**Figura 3:** Curvas de distribuição de tempo de residência para pulsos de acetona em diferentes fluxos velocidades, na coluna de criogel de troca iônica (0,5 cm/min a 5,0 cm/min).



**Figura 4:** Coeficientes de dispersão axial ( $D_{AX}$ ) em diferentes velocidades de superfície da fase móvel através da coluna de criogel de troca iônica.



**Figura 5:** Altura equivalente a uma placa teórica em diferentes fluxos de fase móvel (0,5  $\text{cm}/\text{min}$  a 7  $\text{cm}/\text{min}$ ), na coluna de criogel de troca iônica.

### Ensaio de purificação

Os ensaios de adsorção foram conduzidos em diferentes valores de pH e diferentes concentrações de sal ( $T_{RIS-HCl}$ ) e os resultados experimentais de rendimento e fator de purificação são mostrados na Tabela 2. É possível observar na Tabela 2 que o tratamento 9 (pH 7,8 e  $[T_{RIS-HCl}]$  100 mM) apresentou o maior fator de purificação e maior rendimento. Fazendo uma análise individual de cada tratamento em termos de fator de purificação e rendimento é possível observar que o tratamento que apresentou o segundo melhor valor para fator de purificação foi o tratamento 8 (pH 7,8 e  $[T_{RIS-HCl}]$  20 mM), observando uma interferência positiva do pH no ensaio de adsorção da faseolamina, uma vez que as melhores condições para fator de purificação ocorreram na mesma condição de pH (pH 7,8), mesmo estando presente nas condições estudadas de maior e menor concentração de  $T_{RIS-HCl}$  respectivamente,  $[T_{RIS-HCl}]$  100 mM e  $[T_{RIS-HCl}]$  20 mM.

Dentre os tratamentos é possível verificar que em pH 7,8 a faseolamina possui uma carga líquida negativa devido a encontrar-se em um pH acima do seu ponto isoelétrico ( $pI_{medio}$  5,1), e a polietilenoimina possui o  $pK_a$  na faixa de 8,18 a 9,9 e encontra-se com predominância de cargas positivas, e assim, para a adsorção tem a contribuição das interações eletrostáticas e também de interações hidrofóbicas, aumentando a solubilidade da faseolamina no meio deixando-a mais disponível para fazer mais interações iônicas e mais ligações de hidrogênio com o adsorvente (VON HARPE, 2000).

Ainda, o efeito salt in promove exposição de grupos hidrofóbicos ou mais graus de liberdade para a faseolamina fazer mais interações eletrostáticas. Quanto à concentração de sal, as proteínas de origem vegetal possuem uma maior tolerância a concentrações mais altas, e quando se tem um aumento da concentração de sal, conseqüentemente a faseolamina estava mais solúvel. Nesta situação, a maior concentração de sal (100 mM  $[T_{RIS-HCl}]$ ) exerce uma ação na camada de hidratação, promovendo o aumento da solvatação e uma maior interação da proteína com os íons (DAMODARAN, 2010).

Em um estudo também de purificação parcial de proteína vegetal, isolada da soja, Lermen em 2020 encontrou condições ótimas de purificação em concentração de sal de 100 mM  $T_{RIS-HCl}$ , resultados que corroboram com os encontrados neste estudo pois o aumento da adsorção da proteína com o aumento da força iônica pode ser atribuído à contribuição das interações hidrofóbicas.



**Tabela 2** - Condições experimentais do ensaio de adsorção e purificação de proteínas e resultados de Concentração de proteína Alimentação ( $P_A$ ), Atividade Volumétrica na Alimentação ( $A_A$ ), Atividade Especifica na Alimentação ( $A_{SA}$ ), Concentração de proteína no eluído ( $P_E$ ), Atividade Volumétrica no Eluído ( $A_E$ ), Atividade Especifica Eluido ( $A_{SE}$ ) Fator de Purificação ( $F_P$ ) e Rendimento ( $R$ ) de faseolamina no eluído, em função de diferentes condições de pH e de diferentes concentrações de Tris-HCl.

<b>Ensaio</b>	<b>pH</b>	<b>[Tris-HCl] (mM)</b>	<b><math>P_A</math> (mg/mL)</b>	<b><math>A_A</math> (U/mL)</b>	<b><math>A_{SA}</math> (U/mg)</b>	<b><math>P_E</math> (mg/mL)</b>	<b><math>A_E</math> (U/mL)</b>	<b><math>A_{SE}</math> (U/mg)</b>	<b><math>F_P</math></b>	<b><math>R</math> (%)</b>
<b>1</b>	7,2	20	0,764	0,779	1,019	0,270	0,353	1,308	1,283	45,339
<b>2</b>	7,2	100	0,919	0,844	0,918	0,189	0,505	2,673	2,913	59,892
<b>3</b>	8,4	20	0,945	0,745	0,788	0,156	0,395	2,530	3,210	53,037
<b>4</b>	8,4	100	1,197	0,836	0,699	0,173	0,783	4,536	6,491	93,633
<b>5</b>	7,8	60	0,908	0,699	0,770	0,141	0,319	2,264	2,939	45,623
<b>5.1</b>	7,8	60	0,872	0,680	0,780	0,107	0,262	2,452	3,145	38,513
<b>5.2</b>	7,8	60	0,990	0,737	0,745	0,101	0,353	3,498	4,696	47,911
<b>6</b>	7,2	60	0,612	0,699	1,143	0,122	0,285	2,332	2,040	40,729

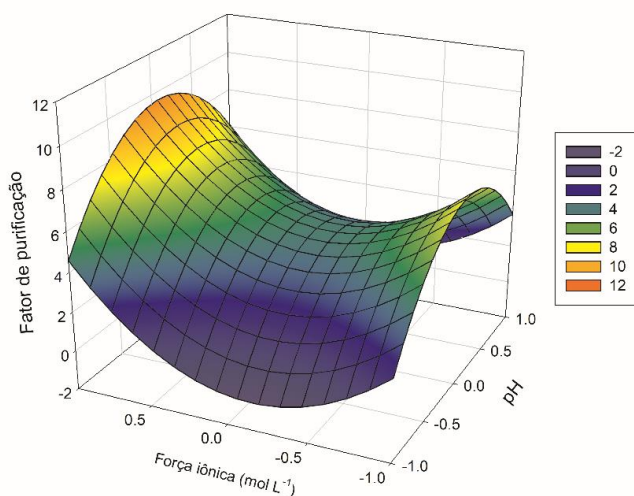
<b>7</b>	8,4	60	1,145	0,753	0,657	0,351	0,254	0,725	1,102	33,805
<b>8</b>	7,8	20	1,143	0,460	0,402	0,097	0,334	3,430	8,523	72,705
<b>9</b>	7,8	100	0,816	0,581	0,713	0,113	0,871	7,722	10,838	149,706

---

Uma análise de regressão foi realizada para ajustar um modelo polinomial quadrático aos dados experimentais de fator de purificação e rendimento em função do pH e concentração de sal. De acordo com a ANOVA, o modelo para rendimento não foi significativo ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, um modelo significativo ( $p > 0,05$ ) foi alcançado para fator de purificação (Fp), e o modelo final foi obtido e descrito em termos de valores codificados pela Equação 11, apresentando um  $R^2$  de 81.16%.

$$Fp = 4,474 + 0,761 x - 4,224 x^2 + 1,204 y + 3,885 y^2 \quad (11)$$

Todos os efeitos dos fatores estudados sobre fator de purificação podem ser melhor visualizados examinando o gráfico de superfície de respostas (figura 06), onde é possível analisar quais as melhores condições para eluição da enzima em estudo, de forma que proporcionam as maiores respostas. A Fig.06 mostra a superfície de resposta do fator de purificação em função do pH e das concentrações de  $T_{RIS-HCl}$ . É possível verificar que o fator de purificação aumentou em condições de pH 7,8 e em concentração de 100mM  $T_{RIS-HCl}$  apresentou melhor resposta. É interessante notar que, mesmo em uma concentração menor de sal 20mM  $T_{RIS-HCl}$ , foi possível obter uma resposta significativa devido a melhor condição de pH observada neste estudo (pH 7,8). Shamsi em 2017, estudando a purificação e caracterização de uma protease utilizando grão de bico, semente verde, encontrou também como melhor condição na purificação, quando utilizou pH 8,2.

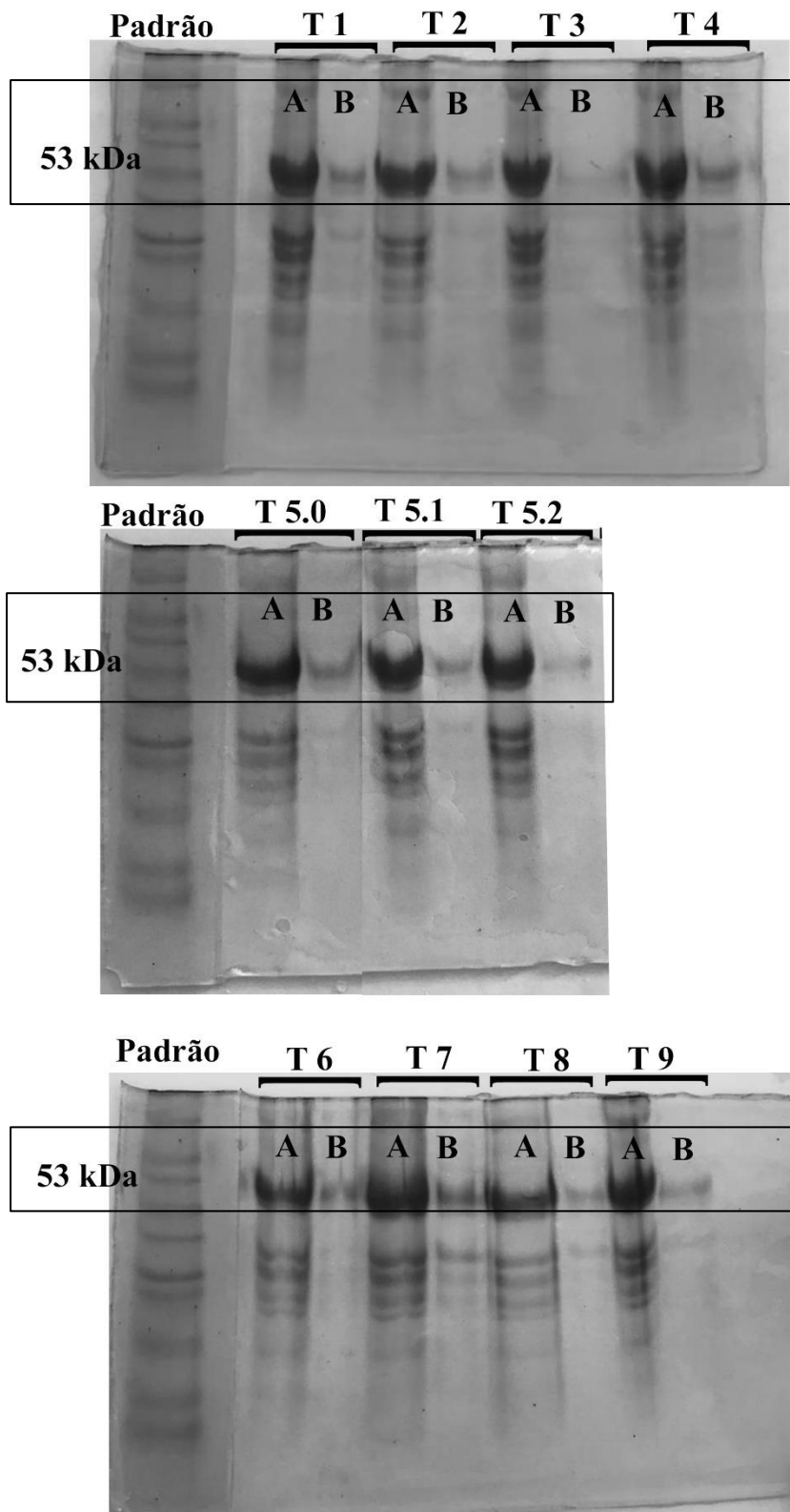


**Figura 6:** Superfície de resposta do Fator de Purificação em função de pH e Tris.

Nas condições experimentais estudadas, a condição ótima correspondeu a maior concentração de sal TRIS-HCl e ao valor de pH 7,8. Nessa condição, o fator de purificação foi de 10,838.

Os perfis eletroforéticos unidimensionais dos isolados proteicos produzidos foram obtidos antes e após o processo de purificação. A Fig. 7 mostra que, apesar dos valores obtidos para fatores de purificação, o extrato bruto foi parcialmente purificado independentemente do pH e da concentração de TRIS-HCl, assim a quantidade de proteínas na amostra eluída foram claramente menores. Em todos os tratamentos houve presença de bandas, sendo umas com mais e outras com menos intensidade. O tratamento 9 foi o tratamento em que as bandas se apresentam mais intensas tanto no extrato quanto na amostra eluída, o que confirma os melhores resultados encontrados de fator de purificação e rendimento deste tratamento. O perfil proteico exibiu predominância das bandas em 53 kDa. Após comparar esse perfil eletroforético com dados da literatura, confirma-se com a faseolamina, estudada neste trabalho que é atribuída à vicilina 7S, uma proteína com sub-unidades polipeptídicas com massa molecular entre 43 a 54 kDa, fato que as bandas encontradas neste estudo, estão dentro desta faixa.

De Sousa et al., (2023) em seu estudo com captura de L-asparaginase, verificaram que vários contaminantes, inicialmente presentes na amostra foram eliminados, fazendo com que conseguissem um aumento na pureza da enzima, o que também foi possível verificar neste trabalho através dos perfis eletroforéticos mostrados na Fig 07.



**Figura 7:** Análise SDS-PAGE do processo de purificação cromatográfica de Faseolamina de feijão branco por criogel de troca iônica em uma única etapa. Padrão: Marcador Molecular; T1

a T9: tratamentos seguindo o delineamento de face centrada conforme mostrado na Tabela 1 e A: alimentação e B: eluído.

## CONCLUSÃO

Um novo criogel de troca aniônica funcionalizado com polietilenoimina foi produzido, caracterizado e avaliado quanto a sua capacidade adsortiva da proteína faseolamina presente no feijão branco. Este estudo demonstrou um método de purificação bem sucedido para faseolamina. O criogel ativado com polietilenoimina quaternizada com epicloridrina apresentou propriedades desejáveis como alta porosidade, baixa dispersão e baixa resistência ao fluxo. A HEPT também foi baixa e não é dependente da velocidade do fluxo.

Os resultados apresentaram maior fator de purificação e maior rendimento em pH 7,8 e concentração de sal de 100mM TRIS-HCl. SDS-PAGE mostrou bandas presentes em todos os tratamentos, mas apenas no tratamento 9 apresentou uma banda mais densa na fração do eluído. Com características típicas de adsorventes supermacroporosos, o criogel apresentou uma estrutura porosa e poros interligados, permitindo sua aplicação em purificação de extratos brutos e viscosos, sendo considerado uma técnica com baixo custo e como matriz promissora para uso em processos de captura de proteínas por troca iônica.

## REFERÊNCIAS

- ALTINTAS, Evrim Banu et al. Use of magnetic poly (glycidyl methacrylate) monosize beads for the purification of lysozyme in batch system. **Journal of Chromatography B**, v. 853, n. 1-2, p. 105-113, 2007.
- AJIBOLA, Comfort F. et al. Polypeptide composition and functional properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) albumin, globulin and protein concentrate. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 189-200, 2016.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BENFELD, P. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ . **Method Enzymol**, v. 1, p. 149-58, 1955.
- CHOI, Woosung et al. Epoxide-functionalization of polyethyleneimine for synthesis of stable carbon dioxide adsorbent in temperature swing adsorption. *Nature communications*, v. 7, n. 1, p. 12640, 2016.
- COELHO, Patrícia Mello. Avaliação da segurança da farinha de feijão branco comercial em modelo murino. 2018. 28 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2018.
- COLAÇO, Priscila Caon; DEGÁSPARI, Cláudia Helena. Benefícios da Faseolamina (*Phaseolus vulgaris* L.)-Uma Revisão. **Visão Acadêmica**, v. 15, n. 1, 2014.
- CUMMINS, P. M.; ROCHFORD, K. D.; O'CONNOR, B. F. Protein chromatography: **Ion exchange chromatography: basic principles and application**. New York:ed. 2,HUMANA PRESS, 2016.
- DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; FENNEMA, Owen R. **Química de alimentos de Fennema, 4ª edição**. Tradução Adriano Brandelli ... [et al.] – Artmed editora, Porto Alegre 2010.
- DE OLIVEIRA, Ana Cristina Freitas et al. Capture of lysozyme on macroporous cryogels by hydrophobic affinity chromatography. **Separation Science and Technology**, v. 55, n. 11, p. 2012-2024, 2020.
- DE SOUSA, Lucas Silva et al. A quaternary amine cryogel column for chromatographic capture of L-asparaginase. **Process Biochemistry**, v. 127, p. 92-98, 2023.
- DO EVANGELHO, Jarine Amaral et al. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. **Food Chemistry**, v. 214, p. 460-467, 2017.

- FONTAN, R. C. I. *et al.* Alternatives for Characterizing Macroporous Polyacrylamide Monolithic Ion Exchanger Columns. **Polymer Engineering and Science**, v. 58, p. 1717 – 1725, 2017.
- FURUSAWA, Takehiko; SUZUKI, Motoyuki; SMITH, J. M. Rate parameters in heterogeneous catalysis by pulse techniques. **Catalysis Reviews Science and Engineering**, v. 13, n. 1, p. 43-76, 1976.
- GUIOCHON, Georges. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, n. 1-2, p. 101-168, 2007.
- HENAO, W. *et al.* Insights into the CO<sub>2</sub> capture over amine-functionalized mesoporous silica adsorbents derived from rice husk ash. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 8, n. 5, p. 104362, 2020.
- JEON, Sunbin *et al.* Double-layer structured CO<sub>2</sub> adsorbent functionalized with modified polyethyleneimine for high physical and chemical stability. *ACS applied materials & interfaces*, v. 10, n. 25, p. 21213-21223, 2018.
- JEON, Sunbin *et al.* Introduction of cross-linking agents to enhance the performance and chemical stability of polyethyleneimine-impregnated CO<sub>2</sub> adsorbents: Effect of different alkyl chain lengths. *Chemical Engineering Journal*, v. 398, p. 125531, 2020.
- LEE, S.-C. .; GEPTS, P. L. .; WHITAKER, J. R. . Protein structures of common bean (*Phaseolus vulgaris*) alpha-amylase inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6618–6627, 2002.
- LERMEN, Andréia Monique. Purificação parcial e caracterização de uma protease bacteriana e sua aplicação na produção de hidrolisados bioativos a partir de proteína isolada de soja. Dissertação de Mestrado, 2020.
- LEVENSPIEL, Octave. **Chemical reaction engineering**. John Wiley & Sons, 1998.
- LOSACCO, Gioacchino Luca *et al.* Automated ion exchange chromatography screening combined with in silico multifactorial simulation for efficient method development and purification of biopharmaceutical targets. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 12, p. 3581-3591, 2022.
- MACIEL, Kátia Silva *et al.* Synthesis and characterization of supermacroporous cryogel with immobilized p-aminobenzenesulfonamide as affinity ligand for the purification of lactoperoxidase from whey. **Journal of Separation Science**, v. 46, n. 3, p. 2200639, 2023.
- MACHADO, Ana Paula F. *et al.* Adsorptive behavior of  $\alpha$ -lactalbumin on cation-exchange supermacroporous monolithic column. **Fluid Phase Equilibria**, v. 401, p. 64-69, 2015.



- MARSHALL, J. JOHN; LAUDA, CARMEN M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 20, p. 8030-8037, 1975.
- MATTA, Lucidarcy Martins da. Feijão comum branco (*Phaseolus vulgaris*): produção de proteico isolado, fracionamento cromatográfico e investigação das propriedades incorporadas. 2020. 142 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2020.
- MEDEIROS, Fabiana Oliveira de. **Adsorção e purificação da enzima beta-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através de cromatografia de troca iônica**. 2008. Dissertação de Mestrado.
- MENG, G. T.; MA, C. Y. Characterization of globulin from *Phaseolus angularis* (red bean). **Food Research International**, v. 35, n. 4, p. 687–695, 2002.
- MENG, Jinxia et al. Polysaccharide from white kidney bean can improve hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic rats. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 24, p. 100222, 2020.
- MESQUITA, Fabrício Rivelli et al. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1114-1121, 2007
- MÓL, Paula Chequer Gouveia et al. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg white. **Journal of Chromatography B**, v. 1044, p. 17-23, 2017.
- MÓL, Paula Chequer Gouveia et al. Production and capture of  $\beta$ -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor made anionic cryogel. **Process Biochemistry**, v. 82, p. 75-83, 2019.
- NADAL, Pedro et al. Extraction, isolation, and characterization of globulin proteins from *Lupinus albus*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2752-2758, 2011.
- NAJAFPOUR, G. *Biochemical Engineering and Biotechnology*. 2 ed. Amsterdã: **Elsevier Science**, 668p. 2015.
- NAM, S.; WALSH, M. K.; YANG, K. Comparison of four purification methods to purify cysteine protease from Asian pear fruit (*Pyrus pyrifolia*). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 86–93, 2016.
- NAWAZ, Haq et al. Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, 2020.
- NEVES, Isabelle Cristina Oliveira et al. Amino acid-based hydrophobic affinity cryogel for

protein purification from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves. **Journal of Chromatography B**, v. 1161, p. 122435, 2020.

OLIVEIRA, Natália Leite et al. Development and characterization of biodegradable films based on *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 499-510, 2019.

PAN, Maomao et al. Separation of lactoperoxidase from bovine whey milk by cation exchange composite cryogel embedded macroporous cellulose beads. **Separation and Purification Technology**, v. 147, p. 132-138, 2015.

PEDDIO, Stefania et al. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)  $\alpha$ -amylase inhibitors as safe nutraceutical strategy against diabetes and obesity: An update review. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 7, p. 2803-2823, 2022.

PUEYO, J. J.; HUNT, D. C.; CHRISPPEELS, M. J. AcVvaVon of bean  $\alpha$ -amylase inhibitor requires proteolytic processing of the pro-protein. **Plant Physiology**. v. 101, p. 1341, 1993.

SANTI-GADELHA, Tatiane et al. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 4, p. 1050-1055, 2006.

SĘCZYK, Lukasz et al. Protein–phenolic interactions as a factor affecting the physicochemical properties of white bean proteins. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 408, 2019.

SHAMSI, Tooba Naz e cols. Purificação e caracterização de uma nova protease tipo tripsina de grão de bico verde (*Cicer arietum*). **Bioquímica e Biotecnologia Preparativa**, v. 47, n. 5, pág. 513-519, 2017.

SHCHUKINA, O. I. et al. Novel polymer-based anion-exchangers with covalently-bonded functional layers of quaternized polyethyleneimine for ion chromatography. **Analytica chimica acta**, v. 964, p. 187-194, 2017.

SILVEIRA, E.; SOUZA Jr., M. E.; SANTANA, J. C. C.; CHAVES, A. C.; PORTO, A. L. F.; TAMBOURGI, E. B. Expanded bed adsorption of bromelain (E.C. 3.4.22.33) from *Ananas comosus* crude extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 149-157, 2009.

STEFANUCCI, Azzurra et al. A Comparative Study on Phytochemical Fingerprint of Two Diverse *Phaseolus vulgaris* var. Tondino del Tavo and Cannellino Bio Extracts.

**Antioxidants**, v. 11, n. 8, p. 1474, 2022 MARQUESI, Emília Torres Costa et al. Effect of supplementation with extract of white bean flour in murine model. **Ciência e Natura**, v. 43, p. e5-e5, 2021.

SUN, S. M.; HALL, Timothy C. Solubility characteristics of globulins from *Phaseolus* seeds

in regard to their isolation and characterization. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 23, n. 2, p. 184-189, 1975.

TANG, C. H.; SUN, X. Structure–physicochemical function relationships of 7S globulins (vicilins) from red bean (*Phaseolus angularis*) with different polypeptide constituents. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 536–544, 2011a.

VERÍSSIMO, Lizzy Ayra Alcântara et al. Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification. **Separation Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 1973-1982, 2017.

VON HARPE, Anke et al. Caracterização de polietileniminas comercialmente disponíveis e sintetizadas para entrega de genes. *Jornal de liberação controlada* , v. 69, n. 2, pág. 309-322, 2000.

YANG, Lirong; XIA, Ying; XIA, Liming. High-level production of a fungal  $\beta$ -glucosidase with application potentials in the cost-effective production of *Trichoderma reesei* cellulase. **Process biochemistry**, v. 70, p. 55-60, 2018.

WHEATLEY, Jeffrey B.; SCHMIDT JR, Donald E. Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports. **Journal of Chromatography A**, v. 849, n. 1, p. 1-12, 1999.