

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE
FASEOLAMINA COMERCIAL E FARINHA
DE FEIJÃO COMO PERSPECTIVA AO
TRATAMENTO DA OBESIDADE E DO
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

LUCIANA LOPES SILVA PEREIRA

2008

LUCIANA LOPES SILVA PEREIRA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE FASEOLAMINA COMERCIAL E
FARINHA DE FEIJÃO COMO PERSPECTIVA AO TRATAMENTO DA
OBESIDADE E DO DIABETES MELLITUS TIPO 2**

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

Orientador

Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

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

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 / Luciana Lopes Silva Pereira. – Lavras: UFLA, 2008.

72 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Custódio Donizete dos Santos.

Bibliografia.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Faseolamina. 3. Antinutrientes. 4. Diabetes. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 612.0151

LUCIANA LOPES SILVA PEREIRA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE FASEOLAMINA COMERCIAL E
FARINHA DE FEIJÃO COMO PERSPECTIVA AO TRATAMENTO DA
OBESIDADE E DO DIABETES MELLITUS TIPO 2**

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

APROVADA em 29 de fevereiro de 2008.

Prof. Dr Raimundo Vicente de Souza

UFLA

Profª. Dra Luciana Alves Pinto

UFLA

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

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

por todas as oportunidades
e por guiar meus passos.

A Deus,

Aos meus pais, Vicente e Mariana,
e ao meu irmão, Vicente
que demonstraram, em todos
os dias da minha vida,
o sentido do amor incondicional,
pleno e infinito.

Ao meu esposo, Chrystian,
pela compreensão, carinho, incentivo e cumplicidade.
Pelo tom de voz, pelo amor nos olhos e nos gestos.
“Estranho seria se eu não me apaixonasse por você”...

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Custódio Donizete dos Santos que, por sua integridade e competência, fez com que a maior realização deste trabalho não fosse a dissertação, mas uma real formação científica e pessoal.

À professora Angelita Duarte Corrêa e ao professor Raimundo Vicente de Sousa, co-orientadores deste trabalho, pelas inúmeras sugestões que contribuíram substancialmente para a qualidade dos resultados, pela disponibilidade e amizade inestimável.

À professora Celeste Maria Patto de Abreu, pela atenção como coordenadora da pós-graduação.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Química, em especial à Miriam, pela ajuda essencial e cordialidade em todos os momentos.

Ao funcionário do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia (DMV), William César Cortez, pela dedicação, receptividade e instrução na realização dos ensaios biológicos.

À Maria Aparecida Teixeira de Siqueira (DMV), pelo auxílio em várias etapas deste trabalho.

A todos os colegas de pós-graduação, em especial a Cristina e a Simone, pela amizade sincera e companheirismo.

As amigas da farmácia, especialmente Moema e Conceição, pelo apoio e ajuda em todos os momentos. Agradeço também à compreensão da proprietária, Maria Lúcia, que incentivou este projeto.

Ao Departamento de Química, ao Departamento de Medicina Veterinária e à UFLA, pela oportunidade.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Aspectos gerais da obesidade e do diabetes.....	4
2.1.1 Prevenção e tratamento.....	5
2.2 Propriedades nutricionais e antinutricionais do feijão	7
2.2.1 Propriedades nutricionais.....	7
2.2.2 Propriedades antinutricionais.....	9
2.2.2.1 Inibidores de enzimas digestivas	10
2.2.2.2 Lectinas	22
2.2.2.3 Saponinas.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Preparo das farinhas dos feijões.....	28
3.2 Composição centesimal	28
3.2.1 Umidade.....	28
3.2.2 Proteína bruta.....	29
3.2.3 Extrato etéreo.....	29
3.2.4 Cinzas	29
3.2.5 Fibra bruta.....	30
3.3 Preparo dos extratos protéicos	30
3.4 Determinação de proteínas.....	30
3.5 Precipitação do extrato protéico bruto com ácido perclórico	31
3.6 Inibição das enzimas digestivas.....	31

3.6.1 Inibição de tripsina.....	31
3.6.2 Inibição de α -amilase.....	32
3.7 Saponina	33
3.8 Atividade hemaglutinante	33
3.9 Inativação térmica.....	35
3.9.1 Eletroforese.....	35
3.10 Ensaio biológico	36
3.10.1 Local	36
3.10.2 Animais.....	36
3.10.3 Preparo da amostra administrada por gavagem	36
3.10.4 Procedimentos.....	37
3.11 Análise estatística	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Composição centesimal	39
4.2 Atividade antitriptica e antiamilásica “in vitro” dos extratos protéicos brutos das farinhas de feijões e da faseolamina.....	40
4.3 Antinutrientes	42
4.3.1 Saponina	42
4.3.2 Lectina	43
4.4 Inativação térmica.....	44
4.4.1 Inibidor de α -amilase	45
4.4.2 Inibidor de tripsina.....	46
4.5 Ensaio biológico	48
4.5.1 Avaliação do crescimento	49
4.5.2 Avaliação da função hepática e pancreática	52
4.5.2.1 Parâmetros bioquímicos.....	52
4.5.2.2 Peso do fígado e intestino delgado + pâncreas	53
5 CONCLUSÕES	56

6 PERSPECTIVAS.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	71

RESUMO

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.** 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica, área de concentração Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A utilização de plantas com fins medicinais representa um vasto campo de pesquisa. Novas propostas terapêuticas necessitam de estudos para avaliar o uso apropriado quanto a posologia, indicação, limitações e riscos de utilização. É crescente a busca de novos fitoterápicos como alternativa ao tratamento medicamentoso tradicional da obesidade e do diabetes mellitus tipo 2. Um exemplo disso é o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), um dos mais importantes componentes da dieta alimentar do brasileiro e matéria-prima para a obtenção do fitoterápico faseolamina (inibidor de α -amilase), indicada para a perda de peso e para diminuir a glicemia pela diminuição da absorção do amido ingerido. O objetivo, neste trabalho, foi realizar um estudo químico comparativo entre a faseolamina comercial e quatro cultivares de feijão e avaliar os efeitos decorrentes do seu uso. Dessa forma, os constituintes químicos (composição centesimal e antinutrientes) e a inibição de enzimas digestivas (α -amilase e tripsina) foram comparados, nas farinhas dos feijões e na faseolamina. Não foram encontradas diferenças significativas nas quantidades de inibidor de tripsina e de α -amilase, nos teores de proteína, ENN, extrato etéreo e nos antinutrientes analisados (saponina e lectina), entre as farinhas de feijões e a faseolamina. Estes resultados fornecem indícios de que não houve purificação do inibidor de α amilase na amostra comercial. Houve, no entanto, maior semelhança entre a faseolamina e o feijão-branco. Portanto, para os ensaios de inativação térmica e ensaio biológico, o feijão-branco foi o escolhido. Para a verificação da inativação térmica, os extratos protéicos brutos obtidos da extração em água 1:10 foram tratados, a 95°C, por 20 minutos. A análise de inibição após corrida eletroforética mostrou que o inibidor de tripsina foi termicamente estável, enquanto o inibidor de α -amilase foi inativado. Sendo assim, o tratamento térmico aplicado com o objetivo de desnaturar o inibidor de

*Comitê Orientador: Dr. Custódio Donizete dos Santos (Orientador), Dra. Angelita Duarte Corrêa– DQI e Dr. Raimundo Vicente de Sousa – DMV (Co-orientadores) – UFLA.

tripsina e preservar o inibidor de α -amilase não foi eficiente. Para a avaliação do efeito biológico, extratos de feijão-branco e faseolamina foram administrados via oral (gavagem), em camundongos, por 24 dias. A dose aplicada foi a indicada na terapêutica (1g/70kg/dia), para cada animal. Um grupo controle recebeu água destilada. Não foram observadas alterações no peso corporal, desenvolvimento, peso do fígado, intestino delgado e pâncreas. Os índices bioquímicos séricos de AST, ALT e amilase também não sofreram alteração em relação ao grupo controle. Na dose e no tempo de administração utilizados não foram observados efeitos deletérios nem a atividade farmacológica esperada.

ABSTRACT

PEREIRA, Luciana Lopes Silva. **Comparative study between commercial phaseolamine and bean flour as a perspective to the treatment of obesity and type 2 diabetes mellitus.** 2008. 72 p. Dissertation (Master in Agrochemistry, major in Agrobiochemistry) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Use of plants of medicinal purposes represents a wide field of research. New therapeutic proposals need studies to evaluate the appropriate use as to posology, indication, limitations and risks of utilization. The search for new phytotherapeutic ones as an alternative to the traditional medicinal treatment of obesity and of the type 2 diabetes mellitus has been growing. An example of that is bean (*Phaseolus vulgaris* L.), one of the most important components of the Brazilian's food diet and raw matter for the obtaining of the phytotherapeutic one phaseolamine (inhibitor of α -amylase), indicated for weight loss and to decrease glucemia for the decrease of the absorption of ingest starch. The objective in this work was to conduct a comparative chemical study between commercial phaseolamine and four bean cultivars and to evaluate the effects due to its use. In this way, the chemical constituents (centesimal composition and anti nutrients) and inhibition of digestive enzymes (α -amylase and trypsin) were compared in the bean flours and in phaseolamine. No significant differences were found in the amounts of trypsin and α -amylase inhibitor and in the contents of protein, NFE, ether extract and in the investigated anti-nutrients (saponin and lectin) between bean flours and phaseolamine. These results furnish clues that there was no purification of α amylase inhibitor in the commercial sample. There was, nevertheless, a greater similarity between phaseolamine and white bean. Therefore, for the heat inactivation assays and biological assay, white bean was the chosen one. For verification of heat inactivation, the crude protein extracts obtained from extraction in water 1:10 were treated at 95°C for 20 minutes. The inhibition analysis after electrophoresis run showed that the trypsin inhibitor was thermally stable while the α -amylase inhibitor was inactive. So, the thermal treatment applied with the purpose of denaturing trypsin inhibitor and of preserving α -amylase inhibitor was no efficient. For evaluation of the biological effect, white bean extracts and phaseolamine were administered via oral (gavage) in mice for 24 days. The

*Guidance Committee: Dr. Custódio Donizete dos Santos (Adviser), Dr. Angelita Duarte Corrêa– DQI and Dr. Raimundo Vicente de Sousa – DMV (Co-advisers) – UFLA.

applied dose was the one indicated in the therapeutics (1g/70Kg/day) to each animal, a control group was given distilled water. No alterations were found in body weight, development, liver weight, small intestine and pancreas. The biochemical serum indices of AST, ALT and amylase also did not undergo alteration in relation to the control group. At the dose and administration time used, neither deleterious effects nor expected pharmacological activity were found.

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

Estima-se que US\$ 100 milhões foram aplicados, nos últimos 10 anos, em pesquisa científica relacionada a produtos naturais e, apesar disso, nenhum medicamento baseado em plantas medicinais foi desenvolvido no Brasil, pelo setor público. Na década de 1990, o uso de fitoterápicos intensificou-se e o mercado mundial de fitoterápicos obteve, em 1997, um faturamento de US\$ 12,4 bilhões. Atualmente, ele é da ordem de cerca de US\$ 22 bilhões, com um crescimento de 12% ao ano. A Europa movimentou US\$ 7 bilhões, no mesmo período, sendo a Alemanha responsável por 50% deste montante, pois naquele

país, a fitoterapia é a escolha predominante. Cerca de um terço dos medicamentos de venda livre na Alemanha é de origem natural (Soler, 2000).

Vários fitoterápicos são largamente utilizados na terapêutica com fins anorexígenos e hipoglicemiantes. Contudo, o documento do Consenso Latino-Americano cita formas de tratamento, muito utilizadas no nosso meio, como não recomendadas para o tratamento da obesidade, pela absoluta falta de evidências científicas de sua eficácia. Estão citadas neste grupo a acupuntura, a fitoterapia, a mesoterapia, as fórmulas magistrais ditas naturais, os diuréticos e os laxativos.

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

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos mais importantes componentes da dieta alimentar do brasileiro e matéria-prima para a obtenção do inibidor de α -amilase, denominado, por Marshall & Lauda (1975), de faseolamina. É uma fonte importante de energia e proteína, portanto, a presença de compostos como os inibidores de tripsina, de amilase, lectinas e saponinas é de conhecida toxicidade e estes compostos são denominados fatores antinutricionais.

O papel dos fatores antinutricionais tem sido rediscutido, em função de descobertas que evidenciam o potencial de algumas dessas substâncias em exercer funções benéficas ao organismo humano. A habilidade do inibidor enzimático em prestar contribuição no tratamento de diabetes, por meio da ação inibidora de α -amilase, é exemplo da diversidade de atuação dessas substâncias.

Os inibidores da enzima α -amilase (faseolamina), extraídos do feijão, com efeitos na inibição da digestão e absorção do amido, têm sido utilizados na terapêutica como complementadores de dietas para perda de peso e efeito hipoglicemiante, em pacientes portadores de diabetes mellitus não-insulino dependentes.

Os processos de purificação do inibidor de α -amilase, descritos por Marshall & Lauda (1975) e Pusztai (1995), compreendem centrifugação, cromatografia de troca iônica, cromatografia de filtração molecular, diálise e liofilização. O rendimento final nos vários processos varia de 1,5g a 3,82g do inibidor de α -amilase por quilo de feijão. A purificação em escala industrial é, dessa forma, onerosa e de baixo rendimento. Estas constatações sugeriram um estudo comparativo entre a faseolamina comercial com as farinhas dos feijões crus.

Portanto, esta pesquisa foi realizada com o objetivo geral de realizar um estudo químico para comparar a faseolamina comercial e a farinha de quatro cultivares de feijão e avaliar os efeitos fisiológicos do seu uso.

Objetivos específicos:

- quantificar os principais constituintes químicos da faseolamina comercial e das farinhas dos feijões;
- testar a inativação térmica dos inibidores de enzimas digestivas do feijão-branco e da faseolamina comercial, no intuito de desnaturar o inibidor de tripsina e manter a atividade do inibidor de α amilase;
- avaliar os efeitos do uso subcrônico da faseolamina comercial e do feijão-branco, utilizando camundongos como modelos experimentais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da obesidade e do diabetes

A alta prevalência e a importância das co-morbidades fazem com que a obesidade seja considerada uma das mais importantes doenças nutricionais do mundo ocidental (Mokdad, 1999).

A interpretação de obesidade varia de época para época, refletindo os valores culturais e científicos de cada uma. Assim, mulheres com formas arredondadas eram modelos de beleza na Renascença. Apesar desses valores culturais, a obesidade está intimamente relacionada a um aumento na incidência de doenças cardiovasculares, hiperlipidemia, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, entre outras (Bray, 1990).

De acordo com o relatório da Organização Mundial de Saúde (2003) cerca de 58% do diabetes mundial podem ser atribuídos ao índice de massa corporal (IMC) acima de 21 kg/m^2 (massa corporal/altura²). A obesidade e o diabetes mellitus não insulino dependente (DM2) estão interligados. O ganho de peso leva à resistência à insulina por meio de diversos mecanismos. O DM2 resulta da incapacidade do organismo de responder adequadamente à ação da insulina produzida pelo pâncreas. A maior parte dos diabéticos (aproximadamente 90%) apresenta este tipo de doença.

As complicações crônicas do diabetes são frequentes e associadas à elevada morbi-mortalidade. Scheffel et al. (2004), em estudo prévio em 983 pacientes com DM2 em atendimento ambulatorial em diferentes centros no Rio Grande do Sul, observaram que a proporção de nefropatia diabética era de 37%; a de retinopatia diabética, de 48% e a de cardiopatia isquêmica, de 36%.

2.1.1 Prevenção e tratamento

A prevenção primária (dos fatores de risco) se faz com um regime alimentar saudável e atividade física regular. A prevenção reduz ou adia as necessidades de atenção à doença.

A prevenção secundária inclui diagnóstico precoce e tratamento apropriado. Controlar a hipertensão, o colesterol e os níveis de glicemia pode reduzir substancialmente o risco de complicações e desacelerar sua progressão.

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (2003), estudos realizados na China, no Canadá, nos Estados Unidos e em vários países europeus mostram que mais da metade de pessoas com excesso de peso e com tolerância diminuída à glicose conseguiu reduzir a incidência de diabetes por meio de redução de peso e da prática de exercícios físicos.

O diabetes é uma doença dispendiosa não só para o diabético e sua família, mas também para os órgãos de saúde, devido à natureza crônica, à gravidade das complicações e aos meios necessários ao seu controle.

A obesidade é responsável por 2% a 6% do custo total de atenção à saúde de vários países em desenvolvimento; algumas estimativas apontam para até 7%. Os verdadeiros custos são indubitavelmente muito mais altos, uma vez que nem toda patologia associada à obesidade está incluída nos cálculos. Já para o diabetes, os custos com atenção à doença variam de 2,5% a 15% dos orçamentos anuais da saúde. Em 1995, foi estimado que o diabetes mellitus atingia 4% da população adulta mundial e que, em 2025, atingirá 5,4% dela, o que equivalerá a, aproximadamente, 300 milhões de diabéticos (Toscano, 2004).

Os medicamentos que podem ser utilizados no processo de perda de peso são distribuídos em três grupos: os que diminuem a fome ou modificam a saciedade; os que reduzem a digestão e a absorção de nutrientes e os que aumentam o gasto energético (Nonino-Borges et al., 2006).

Para o DM2, o tratamento visa manter o controle glicêmico adequado, seja com dieta hipocalórica, aumento da prática de exercícios físicos ou uso de medicações. Existem, no momento, diversas opções terapêuticas, que podem ser utilizadas isoladamente ou em associações: sensibilizadores da ação de insulina (metformina, tiazolidinedionas), anti-hiperglicemiantes (acarbose), secretagogos (sulfoniluréias, repaglinida, nateglinida), drogas antiobesidade e ou insulina (Araújo et al., 2000).

O *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) mostrou que ocorre piora progressiva da função da célula β -pancreática, independente do tipo de tratamento, e que, após 9 anos de tratamento, apenas 25% dos diabéticos continuam a responder à monoterapia, sendo necessárias associações de múltiplos recursos para melhor controle glicêmico.

Dados a gravidade da doença e os efeitos colaterais da terapia tradicional, a busca por terapias alternativas que possam ser adjuvantes do tratamento da obesidade e do DM2 é imprescindível. O inibidor de α -amilase surge como um promissor aliado por diminuir a absorção de glicose, exercendo potencial efeito na redução da glicemia pós-prandial.

Marshall & Lauda (1975) isolaram uma proteína parcialmente purificada de feijão com propriedade de inibir a α -amilase e a denominaram faseolamina.

Na década de 1980, suplementos contendo inibidores de α -amilase foram comercializados como “bloqueadores de amido”, para o controle de obesidade e DM2. Entretanto, a maior parte daqueles produtos consistia, principalmente, de simples extratos de feijão com baixa atividade antiamilásica e alto conteúdo de lectina e inibidores de tripsina, potencialmente danosos. Nos Estados Unidos, foram comercializados como “starch blockers” e proibidos pelo *Food and Drugs Administration* (Liener et al., 1984).

No Brasil, a faseolamina é comercializada e prescrita por médicos na forma de cápsulas que são manipuladas em farmácias magistrais. A faseolamina

comercial é obtida de fornecedores de matérias-primas, com laudo e certificado de análise. O laudo traz como identificação do produto as seguintes informações:

Matéria-prima: faseolamina.

Origem/procedência: México.

Condições de armazenamento: temperatura entre 15° e 30°C.

Nome científico: *Phaseolus vulgaris*.

Parte da planta: fração do feijão seco.

Classe terapêutica: antiobesidade.

Descrição: pó bege.

Solubilidade: insolúvel em água e em álcool.

Densidade aparente: 0,41g/mL sem compactação.

Perda por dessecação: 4,71%.

Granulometria: máximo de 80 mesh.

Cinzas sulfatadas: 3,88%.

Contagem ativa: 5500U.

2.2 Propriedades nutricionais e antinutricionais do feijão

2.2.1 Propriedades nutricionais

As propriedades nutritivas relacionadas ao feijão comum baseiam-se no fato de ser fonte rica em proteínas (19,6% a 26% da matéria seca - MS), de carboidratos complexos de baixo índice glicêmico (64% a 71% da MS) e pobre em gordura (1% a 2% da MS) (Vieira, 1967).

Um grande número de pesquisadores tem mostrado que as proteínas dos grãos de feijão, isoladas ou não, são deficientes em aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) e contêm alto teor de lisina (Tandon et al., 1957).

O baixo valor biológico das proteínas de *Phaseolus vulgaris* é atribuído a vários fatores, tais como: baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados, estrutura

compacta de proteínas nativas de feijões, que podem resistir à proteólise; compostos antinutricionais, que podem modificar a digestibilidade e alterar a liberação dos aminoácidos (Wu et al., 1995). A digestibilidade das proteínas do feijão, em ratos, situa-se entre 40% e 70%. Em humanos, esta digestibilidade é ainda menor, atingindo não mais que 60% do nitrogênio ingerido (Bressani & Elias, 1984).

Apesar da digestibilidade, o feijão é considerado a “carne do pobre”, em função do seu elevado teor protéico que, juntamente, com o arroz, fornece os aminoácidos necessários à nutrição humana (Prolla, 2006). Além disso, apresenta muitos efeitos funcionais, atribuídos à sua composição química peculiar, pois é também uma fonte importante de fibras (Haro et al., 1995) e de amido resistente (Calixto et al., 1996).

Com relação às fibras contidas nos grãos, Lajolo et al. (1996) destacam seus reconhecidos efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicêmico, além do alto conteúdo de carboidratos complexos e da presença de vitaminas do complexo B.

Há também o benefício do ferro com efeito antianêmico. Canniatti-Brazaca & Silva (1999) encontraram variação no teor de ferro de 6,83 a 15,34 mg ferro/100g MS no feijão-preto, no feijão-comum, no feijão-branco, no grão-de-bico, na soja, no feijão-guandu e na lentilha.

Há muitos anos, pesquisas são desenvolvidas no intuito de relacionar alimentos ingeridos pelos povos e o surgimento e evolução de doenças crônicas. Essas doenças, que tipicamente cursam por dez ou mais anos, incluem principalmente o diabetes mellitus, as dislipidemias, a obesidade e as doenças cardiovasculares (Prolla, 2006). Estudos em animais e em humanos já demonstraram efeitos benéficos das leguminosas sobre algumas destas doenças, inclusive efeitos protetores do feijão sobre o surgimento de câncer (Correa, 1981; Hangen & Ennink, 2003).

2.2.2 Propriedades antinutricionais

Apesar de terem malefícios à saúde reconhecidamente estudados, algumas substâncias classificadas como fatores antinutricionais, atualmente, têm sido consideradas benéficas pelas suas atribuições terapêuticas.

Há muitas substâncias extraídas de plantas que reduzem o nível de glicose no sangue e a grande variedade de classes químicas indica que a variedade de mecanismos de ação deve estar envolvida na redução do nível de glicose no sangue. Algumas dessas substâncias podem ter potencial terapêutico, enquanto outras podem produzir hipoglicemia como efeito colateral devido à sua toxicidade, especialmente hepatotoxicidade (Negri, 2005).

Pusztai et al. (1998) descrevem que componentes do feijão-comum, como a lectina e inibidores de tripsina, podem atuar reduzindo a biodisponibilidade de carboidratos complexos, proteínas e lipídios da dieta humana.

O feijão-comum possui alguns atributos indesejáveis, tais como fitatos, fatores flatulentos, compostos fenólicos, inibidores enzimáticos, hemaglutininas (lectinas) e alergênicos, os quais devem ser eliminados para a sua efetiva utilização como alimento (Gupta, 1987; Sathe et al., 1984).

Grande parte dos fatores antinutricionais é decorrente do mecanismo de defesa das plantas contra insetos-praga e doenças. Há muitos anos vêm sendo estudadas a biossíntese e a regulação de compostos químicos associados aos mecanismos de defesa das plantas. Inicialmente, estas substâncias químicas foram consideradas como sendo compostos secundários, os quais não tinham suas funções bem estabelecidas (Janzen et al., 1986). Sabe-se que essas moléculas são encontradas em vários tecidos vegetais na forma de componentes constitutivos, fazendo parte do plano de desenvolvimento normal da planta (Rosenthal & Janzen, 1979) ou componentes induzidos, sendo sintetizados em resposta ao ataque de pragas ou patógenos (Xavier-Filho, 1993). Entre estes

compostos estão incluídos antibióticos, alcalóides, terpenos e as proteínas de defesa. Dentre estas substâncias de natureza protéica estão incluídas lectinas, inibidores de proteinases, inibidores de α -amilases, quitinases, entre outras (Peumans & Van Damme, 1995).

A presença de fatores antinutricionais protéicos e não protéicos reduz a qualidade nutricional do feijão. Segundo Chubb, citado por Brigide (2002), os fatores antinutricionais são classificados com base no tipo de nutriente que afeta, como também pelo tipo de resposta biológica produzida no animal. Distinguem-se três grupos:

- substâncias que prejudicam a digestibilidade ou a utilização metabólica das proteínas. São os inibidores de enzimas digestivas, lectinas (hemaglutininas), saponinas e os compostos fenólicos;
- substâncias que reduzem a solubilidade ou interferem na utilização de elementos minerais: ácido fítico, ácido oxálico, glicosinolatos, gossipol;
- substâncias que inativam ou aumentam o requerimento de certas vitaminas. Antivitaminas lipossolúveis A, D, E e K e antivitaminas hidrossolúveis: tiamina, ácido nicotínico, piridoxina e cianocobalamina.

2.2.2.1 Inibidores de enzimas digestivas

Na literatura são relatados, em feijão (*Phaseolus vulgaris*), dois tipos de inibidores de enzimas digestivas, um que inibe o grupo das enzimas proteolíticas associadas à serina, destacando-se o inibidor de tripsina e outro que inibe as α -amilases de origem animal e de insetos (Durigan, 1985).

a) Proteases

Protease é a denominação geral para todas as proteínas com atividade proteolítica. As proteases são divididas em endopeptidases, quando hidrolisam ligações peptídicas internas e exopeptidases, quando hidrolisam ligações N-

terminais ou C-terminais. As endopeptidases são também denominadas proteinases (Ryan & Walker-Simmons, 1981).

As proteinases são classificadas, de acordo com a União Internacional de Bioquímica, em quatro grandes classes: proteinases serínicas, cisteínicas, aspárticas, e metaloproteinases (Tabela 1). O sistema de classificação baseou-se numa comparação entre sítios ativos, mecanismo de ação e estrutura tridimensional das proteinases (Neurath, 1996).

TABELA 1. Famílias de proteinases.

FAMÍLIAS	PROTEINASES
Proteinase serínica I	Quimotripsina
	Tripsina
	Elastase
Proteinase serínica II	Subtilisina
Proteinase cisteínica	Papaína
	Actidina
	Catepsina B e H
	Caspases
Proteinase aspárticas	Penicilopepsina
	Proteinases ácidas
	Renina
Metaloprotease I	Carboxipeptidase bovina A
Metaloprotease II	Termolisina

Fonte: Gomes, (2004).

b) Inibidores de proteinases

Os inibidores de proteinases são polipeptídeos que possuem a capacidade de se ligar às enzimas proteolíticas (Franco et al., 1999).

Os inibidores de proteinases foram divididos em classes de acordo com suas atividades específicas, como demonstrado na Tabela 2. Os mais abundantes e estudados são aqueles capazes de inibir as serinoproteinases, grupo das tripsinas e quimiotripsinas (Terra & Ferreira, 1994).

TABELA 2 Inibidores de proteinases de plantas.

CLASSES	FAMÍLIA	BIBLIOGRAFIA
Inibidores de proteinases serínicas	Inibidor de tripsina da soja (Kunitz)	Garcia-Olmedo et al. (1987)
	Inibidor de Bowman-Birk (BBI)	
	Inibidor de tripsina da cevada	Ryan (1990) Shivaraj & Pattabiraman (1981).
	Inibidor de batata I e II	
	Inibidor de abóbora	
Inibidores de metalo-proteinases	Inibidor bifuncional de milho/ Ragi I-2.	Keilova & Tomasek (1977).
	Inibidor de carboxipeptidase A, B.	
Inibidores de proteinases cisteínicas	Inibidor de proteinase cisteínica (fitocistatina).	Abe et al. (1987).
Inibidores de proteinases aspárticas	Inibidor de proteinase aspártica	Mares et al. (1989)

Fonte: Gomes, (2004).

Sabe-se que as sementes de leguminosas são grandes reservas de proteínas em seus cotilédones e de inibidores de proteinases. As sementes contêm formas múltiplas do inibidor tipo BBI em monômeros e dímeros.

Estudos do estado de associação do inibidor revelaram o papel das interações carregadas no equilíbrio monômero \leftrightarrow dímero. Os estudos químicos da modificação de Lys e de Arg confirmaram o papel de interações da carga nesse equilíbrio. Estes resultados suportam a premissa de que uma interação original, que estabilize o dímero, é a causa da associação entre os monômeros nos inibidores. A interação entre o grupo amino da Lis24 de um monômero e a extremidade carboxi terminal de Asp76 do outro monômero ocorre no processo de dimerização dos BBI do feijão. Esta associação com outro monômero é vital ao papel fisiológico e funcional dos BBI porque aumenta a estabilidade térmica e a resistência ao ataque de enzimas, estabilizando a conformação do segundo sítio reativo no domínio carboxi terminal (Kumar et al., 2004).

Mecanismo de ação

O mecanismo de ação de um inibidor de proteinase baseia-se na inibição competitiva de uma proteinase, via bloqueio de sua atividade proteolítica (Figura 2). O mecanismo pelo qual os inibidores de proteinases interferem no processo digestivo dos insetos se deve à diminuição da assimilação de nutrientes prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento e ao desenvolvimento (Frizzas et al., 2004).

A maioria dos inibidores de proteases serínicas reage com suas enzimas cognatas por meio de um mecanismo semelhante ao que ocorre na ligação enzima-substrato (Laskowski & Katto, 1980). Esse grupo de inibidores compreende, geralmente, proteínas pequenas, com 29 a 190 resíduos de aminoácidos e todas elas possuem alça ligante exposta (Bode & Huber, 1992). A formação do complexo enzima-inibidor ocorre rapidamente, mas a sua

dissociação é lenta e resulta em enzima livre e em um inibidor clivado, o qual sofre desnaturação e degradação. Na formação deste complexo estão envolvidas interações entre as cadeias do inibidor e a proteinase, tais como pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals. A presença de pontes de dissulfeto é indispensável para que o inibidor adquira uma conformação que lhe possibilite conectar-se à proteinase (Ardelt & Laskowski, 1991).

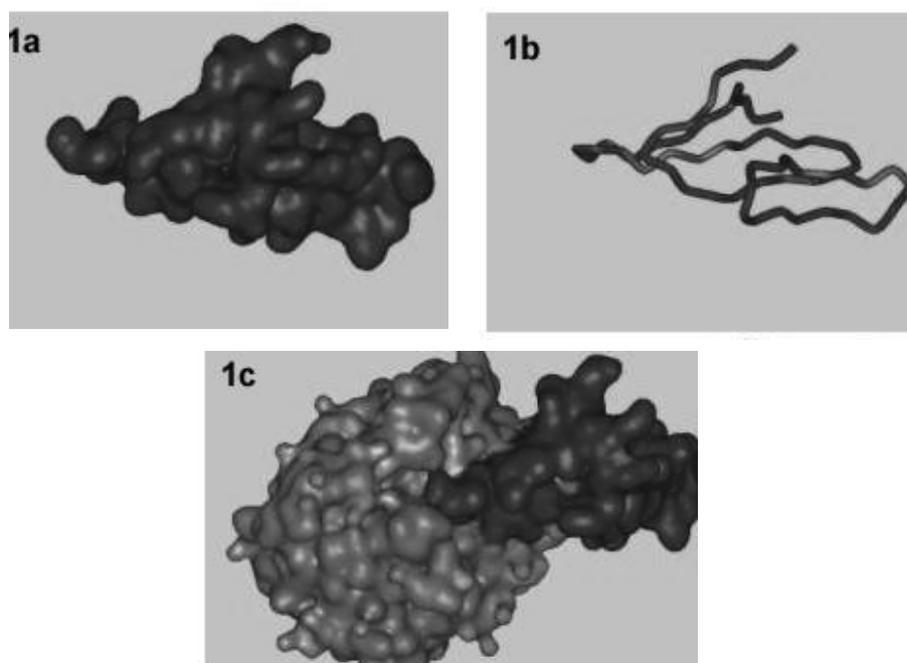


FIGURA 2. Estrutura tridimensional do inibidor de Bowman Birk. Em (a) é mostrada a área superficial do inibidor. Em (b) é mostrado o esqueleto molecular que dá forma ao inibidor. Em (c) pode-se observar a interação inibidor (vermelho) e tripsina suína (azul) (Koepke et al., 2000).

A formação do complexo enzima-inibidor envolve, ainda, a formação de uma ligação peptídica no inibidor e a presença de elementos essenciais no sítio ativo da enzima. O mecanismo da catálise é comum para as proteinases em geral e a estrutura foi bastante estudada por meio de técnicas de difração de raios X (Franco et al., 1999).

Efeitos nocivos

Os inibidores de proteases das leguminosas provocam efeitos nocivos em animais, formam complexos inativos com a tripsina e a quimotripsina. Portanto, o nível de enzimas digestivas livres para atuarem diminui, dificultando, assim, a proteólise e a absorção de proteínas adquiridas na dieta. Estes complexos enzima-inibidor, ricos em aminoácidos sulfurados, são excretados. Os inibidores provocam uma hipertrofia/hiperplasia do pâncreas, devido à hipersecreção crônica de enzimas digestivas. Conseqüentemente, os aminoácidos sulfurados destinados a sintetizar proteínas do tecido corporal são desviados para a síntese destas enzimas. Estes fatos levam a uma redução do conteúdo de aminoácidos essenciais, ocasionando inibição do crescimento, agravada pelo fato de as proteínas das leguminosas serem deficientes de aminoácidos sulfurados (Jorba, 2005).

c) α -Amilases

As α -amilases (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) são enzimas monoméricas que constituem uma família de endoamilases e catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 dos carboidratos. Essas enzimas têm um papel importante no metabolismo de carboidratos em plantas, em animais e em outros organismos (Franco et al., 1999).

Em mamíferos, as α -amilases estão presentes na saliva e na secreção pancreática. A amilase pancreática é regulada pela ação do hormônio colecistoquinina (Qian et al., 2005).

A amilase pancreática humana (APH) é responsável por hidrolisar polissacarídeos grandes em oligossacarídeos menores, que são posteriormente hidrolisados pelas α -glicosidases intestinais (Figura 3). Este processo da digestão é importante para a absorção de glicose do intestino para o sangue. Portanto, o controle da atividade de APH pode ser usado como forma de controlar os níveis de glicose no sangue. A atividade de APH diminuída, correlacionada aos níveis de glicemia pós-prandial pelo uso de inibidores da α -amilase, foi utilizada com sucesso no tratamento de doenças, como o diabetes ou a obesidade, nas quais o controle do nível de glicose do sangue é essencial (Numao, 2004).

Observam-se as seguintes estruturas na cadeia polipeptídica: regiões helicoidais, regiões de folha β pregueada e espirais. As posições de ligação de cloreto (um ativador catalítico) e de cálcio (um estabilizador estrutural) são indicadas com as esferas. São mostradas também as posições obrigatórias dos subsítios de ligação do inibidor -1 e -3. Fonte: Numao, (2004).

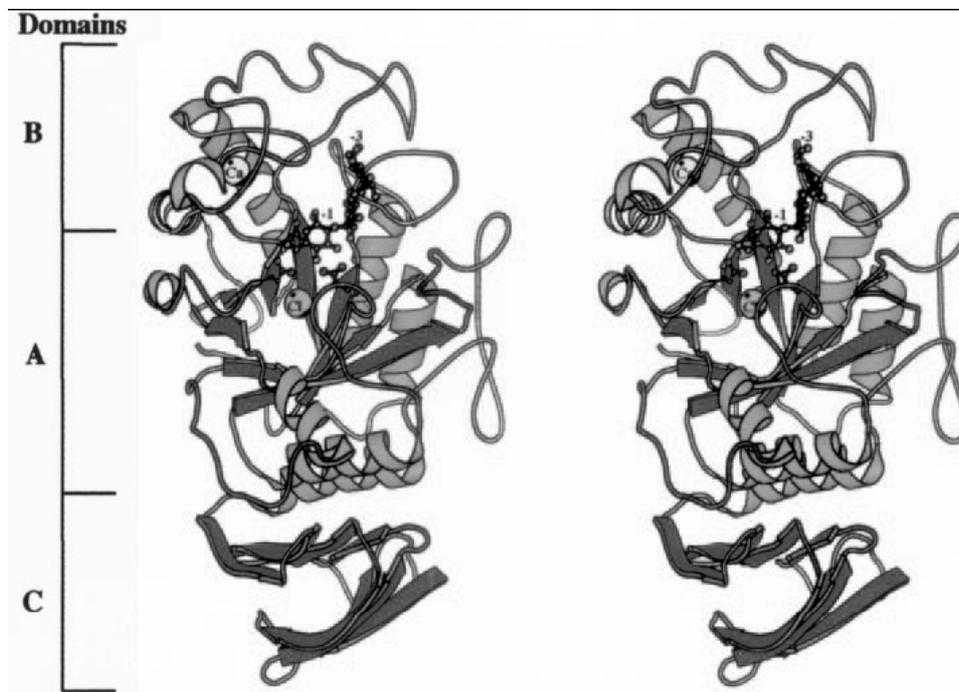


FIGURA 3 Estrutura tridimensional da α amilase pancreática humana; dobrada em três domínios (A, B e C).

d) Inibidores de α -amilases

As plantas apresentam várias proteínas inibidoras de α -amilase. Esses inibidores podem ser encontrados em cereais (Feng et al., 1996), como no trigo (*Triticum aestivum*), em leguminosas, no feijão (*Phaseolus vulgaris*) e em outras famílias de vegetais.

Os inibidores de α -amilase (α AI) são compostos que a inativam pela formação de complexos enzima-inibidor. Baseando-se na natureza química, há três tipos de inibidores de α AI, a saber: (a) carboidratos nitrogenados microbianos, (b) peptídeos microbianos e (c) proteínas de vegetais superiores. A

investigação de α AI naturais é importante pelo seu efeito no controle de insetos específicos e na nutrição humana (Lee et al., 2002).

No feijão, foi demonstrada a presença de dois inibidores de α -amilase, chamados α AI1 e α AI2, que diferem em suas especificidades contra diferentes α -amilases. Enquanto o α AI1 inibe a α -amilase de pâncreas de suíno (APS) assim como as α -amilases dos bruquídeos *Callosobruchus maculatus* e de *C. chinensis*, o inibidor α AI2 inibe as α -amilases do *Zabrotes subfasciatus* (Grossi de Sá & Chrispeels, 1997). Nenhum desses inibidores presentes em sementes de feijão teve efeito contra as α -amilases do bruquídeo *Acanthoscelides obtectus* (Franco et al., 1999).

Lee et al. (2002), estudando a estrutura protéica de inibidores de α -amilases de feijão-comum, verificaram locais com clivagem proteolítica situados entre Asp77 e Ser78 para pro- α AI4 (feijão-branco) e pro- α AI5 (feijão-preto). Eles determinaram estes inibidores α AI4 e α AI5, tendo seqüência de aminoácidos 93% e 95% idêntica ao α AI-1. Uma curvatura ao lado de Asp77 em estruturas tridimensionais modelo dos proinibidores α AI4 e α AI5 indica que uma clivagem proteolítica é necessária para a ativação da proteína. O α AI4 ativo é composto de quatro subunidades (2α e 2β) (Figura 4) e teve um peso molecular de 56.714 kDa, determinado por espectrometria de massa por tempo de voo.

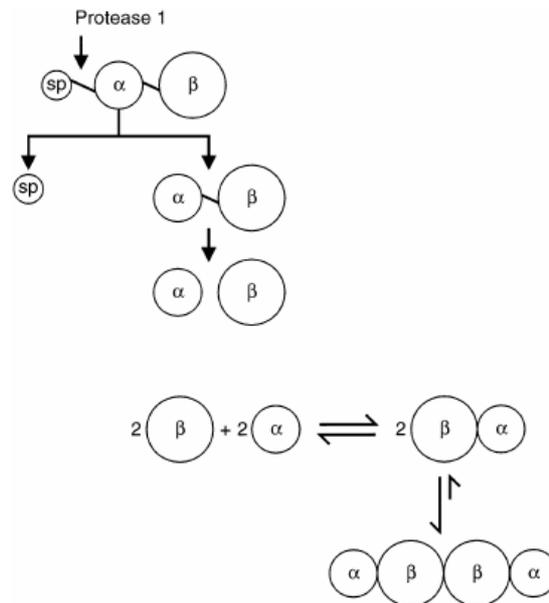


FIGURA 4 Modelo de composição estrutural do inibidor de α amilase do feijão-branco (sp: peptídeo sinalizador, α : 11375 peptídeos e β : 16600 peptídeos). Fonte: Lee et al. (2002).

Mecanismo de ação

O mecanismo de interação e especificidade inibidor-amilase é extremamente complexo e, embora ainda não totalmente desvendado, avanços têm sido demonstrados nessa área para melhor compreensão da especificidade da interação. Estruturas de complexos imaginários foram moduladas para fornecer análises comparativas quanto às diferenças de especificidade, apontando possíveis aminoácidos responsáveis (Frizzas et al., 2004).

Kluh et al. (2005) compararam seqüências de α -amilases sensíveis e insensíveis ao α A11 e determinantes críticos foram localizados no modelo espacial de α A11. Com base em análises “in vitro” de especificidade inibitória e

atividade “in vivo” pela ingestão de α AII, foi demonstrada supressão do desenvolvimento de larvas em insetos com α -amilases sensíveis ao inibidor.

A região de contato do inibidor com a enzima foi definida por cristalografia de raio X do complexo α AII- α amilase pancreática de suíno (Figura 5). Esta região representa uma grande área (1.500 Angstroms) na superfície da enzima, com 50 resíduos responsáveis pela interação com α AII (Kluh et al., 2005).

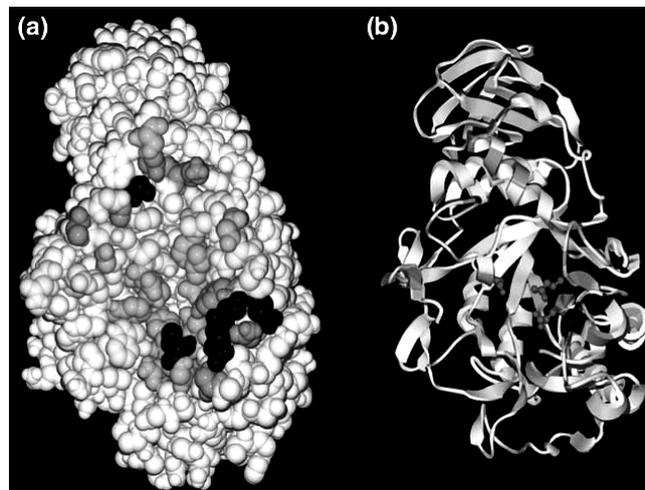


FIGURA 5 Análise de região de interação entre a α amilase e α AII. Representação de superfície (a) e ribbon (b). Os resíduos de aminoácidos da α -amilase que interagem com α AII estão representados em cinza e em preto (a). As cadeias laterais de resíduos de aminoácidos conservados, essenciais para a atividade catalítica de α -amilase (tríade Asp/Glu/Asp), são indicadas em (b). Fonte: Kluh et al, (2005).

Kasahara et al. (1996) sugeriram uma proporção estequiométrica de 2:1, em que uma única molécula de inibidor α AI1, por meio de dois sítios de ligação independentes, se liga e inibe duas moléculas de amilase de pâncreas de suíno.

O mecanismo de inibição é complexo. Santimone et al. (2004) sugeriram um mecanismo de inibição mista do tipo não competitiva, envolvendo formação de complexos EI, EI2, ESI e ESI2.

Ações terapêuticas

Estudos em humanos mostraram que a perfusão de inibidor de α -amilase parcialmente purificado no duodeno inibiu significativamente a atividade da amilase durante a digestão de amido (Layer et al., 1985). A ingestão de inibidor purificado, junto com 50g de amido, reduziu os níveis de glicemia pós-prandial em indivíduos diabéticos (Layer et al., 1986). O efeito a longo prazo do uso do inibidor de α -amilase intraluminal no trato gastrointestinal foi, contudo, pouco estudado (Tormo et al., 2004).

2.2.2.2 Lectinas

Geralmente, as lectinas (hemaglutininas) estão distribuídas por todas as partes da planta. A maior parte, porém, é encontrada nos órgãos de armazenamento. Outras partes das plantas, como folhas, caule, raízes e flores, principalmente, contêm pouca quantidade que não necessariamente é idêntica em estrutura ou especificidade a carboidratos às lectinas de órgãos de armazenamento (Rüdiger, 1998).

As lectinas são, geralmente, ricas em aminoácidos ácidos e básicos e pobres em aminoácidos contendo enxofre, sendo a maioria uma glicoproteína com conteúdo de açúcar variável.

Algumas lectinas são classificadas como metaloproteínas, pois necessitam de cátions, como Ca^{2+} e Mn^{2+} , para realizar a sua atividade

hemaglutinante. Estes íons estão associados a uma série de aminoácidos conservados que participam da ligação ao carboidrato (Moreira et al., 1990; Murdock & Shade, 2002).

Lectinas são, geralmente, glicosiladas e compostas de 2 ou 4 monômeros ligados não covalentemente. O peso molecular das lectinas de plantas varia de 8,5 a 265 kDa, como em *Urtica dioica* (Broekaert et al., 1989) e *Phaseolus lunatus* (Moreira et al., 1990), respectivamente.

Uma das propriedades gerais de muitas proteínas que está diretamente envolvida com o mecanismo de defesa de plantas é sua acentuada estabilidade em amplas faixas de pH e temperatura. Muitas lectinas de plantas não são degradadas por proteases do intestino de animais e insetos (Peumans & Damme, 1995).

Todas lectinas de leguminosas são relatadas a nível molecular, mas mostram uma variação na especificidade de ligação ao carboidrato. Esta ampla especificidade certamente contribui para o sucesso da lectina de legume como uma ferramenta indispensável na pesquisa biológica e biomédica, sendo usada como proteína bioativa na pesquisa e na medicina (Van Damme et al., 1998, Peumans & Damme, 1998).

Efeitos nocivos

O efeito tóxico das lectinas deve-se à sua alta resistência à degradação proteolítica “in vivo” e à sua capacidade de reconhecer receptores específicos de células da mucosa intestinal, causando uma interferência não específica na absorção de nutrientes. Esta redução da biodisponibilidade de nutrientes também se deve à ação direta das lectinas sobre as enzimas digestivas (peptidases, dissacaridases, fosfatases e amilases), diminuindo, assim, a atividade enzimática.

A maioria das lectinas é capaz de resistir à ação enzimática do trato digestivo. Maenz et al. (1999); demonstraram que 60% das lectinas da soja

chegam intactas ao intestino e se ligam a carboidratos das membranas, provocando desorganização e destruição dos microvilos, interferindo seriamente na digestão e na absorção, reduzindo a secreção de enzimas pelos enterócitos, provocando hipersecreção de proteína endógena com maior produção de muco e perdas de proteínas plasmáticas. Estudos utilizando feijão demonstraram que pelo menos 25% da redução no crescimento de ratos alimentados com dietas à base de feijão cru se deve à lectina.

A toxicidade das lectinas é variável. Algumas mostram efeitos deletérios em animais, podem interferir no balanço hormonal produzindo alterações no metabolismo de lipídeos e proteínas, que culminam em uma diminuição severa do crescimento, podendo ocasionar a morte do animal (Thompson, 1993).

Ações terapêuticas

A atividade hipoglicemiante do extrato das sementes de *Urtica pilulifera* L. (Urticaceae) é atribuída à presença de lectinas, glicoproteínas que se ligam especificamente a resíduos de açúcar. A ação hipoglicemiante da lectina corresponde ao aumento tanto da secreção de insulina por meio das células β , quanto da liberação da insulina de seus receptores, podendo, também, mimetizar a ação da insulina pela interação com os resíduos de carboidratos de glicoproteínas dos receptores de insulina. As lectinas podem, também, aumentar a secreção da mucosa intestinal, modificando a absorção da glicose (Kavalali et al., 2003).

Para avaliar o efeito da administração de extrato de feijão-comum contendo alto teor de lectina (27g/kg refeição) sobre o crescimento e o metabolismo, Pusztai et al. (1998) compararam ratos obesos Zucker com ratos magros controle alimentados com lactalbumina. A dieta teste oferecida era isonitrogenada, em relação à dieta controle, contendo 50g ou 150g de lipídios e até 130g de extrato de feijão por kg de dieta. Após 10 dias do experimento,

observou-se que tanto os animais obesos como os magros reduziram seu crescimento com o consumo de dieta contendo o extrato de feijão comum, de maneira dose-dependente, quando comparados com os grupos controle. No entanto, os animais que receberam o extrato de feijão apresentaram menos gordura corpórea, com manutenção do tecido magro em relação aos seus controles. Quando o teor de lipídios da dieta foi aumentado para 150g/kg e o teor de lectina para 0,4g/kg de peso corpóreo/dia, os ratos obesos perderam peso exclusivamente pela redução do tecido adiposo com preservação de músculo esquelético. Mas, quando a mesma dieta foi oferecida aos animais magros, ocorreu significativa perda de proteína corpórea. Os níveis plasmáticos de insulina mantiveram-se significativamente reduzidos e o pâncreas não aumentou nos animais obesos alimentados com o extrato de feijão por 10 dias. Apesar de a lectina (fitohemaglutinina) proveniente do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) ter sido eficiente na redução do teor de lipídios totais plasmáticos, a substância apresentou efeito antinutricional importante, prejudicando o desenvolvimento de ratos.

Cabe perguntar qual é a dose mínima útil de extrato de feijão que não causa efeitos adversos sobre o peso corpóreo ou o tecido muscular.

Estudos sugeriram que a toxicidade de preparações de lectina de *P. vulgaris* a bruquídeos era devido a uma proteína contaminante inibidora de α -amilase (Altabella & Chrispeels, 1990). Contudo, esta observação parece ser específica para *P. vulgaris*, e não é o caso de preparações de lectina de outras espécies (Frizzas et al., 2004).

2.2.2.3 Saponinas

As saponinas, também chamadas de saponosídeos e glicosídeos saponínicos, recebem este nome, pois quando dissolvidas em soluções e agitadas, formam espuma abundante, assemelhando-se ao sabão. A formação

desta espuma ocorre devido à sua estrutura química, em que açúcares solúveis estão ligados a esteróides lipofílicos ou triterpênicos. Assim, são derivadas de triterpenóides tetracíclicos, possuem sabor amargo e acre e os medicamentos que as contêm são esternutatórios (provoca espirros) e irritantes para as mucosas (Oliveira et al., 2003; Robbers et al., 1996).

Com base no núcleo fundamental aglicona, as saponinas podem ser classificadas como esteroidais ou triterpênicas. Saponinas esteroidais estão presentes, na maioria das vezes, em monocotiledôneas e participam da síntese de hormônios esteroidais vegetais; já as saponinas triterpênicas são encontradas mais facilmente nas dicotiledôneas, especialmente na família Sapindaceae, Sapotaceae, Polygonaceae, Caryophyllaceae e Araliaceae, sendo as saponinas triterpênicas as mais abundantes da natureza (Oliveira et al., 2003; Robbers et al., 1997).

As saponinas destroem os corpúsculos das hemácias por hemólise e são tóxicas aos seres humanos e especialmente aos animais pecilotérmicos, sendo muitas saponinas utilizadas como venenos para peixes, insetos e moluscos (algumas são usadas para o controle de caramujos transmissores da esquistossomose) (Oliveira et al., 2003; Robbers et al., 1997).

Efeitos nocivos

Saponinas administradas por via intravenosa produzem inflamação local, podendo provocar a morte do indivíduo pela ruptura massiva de eritrócitos. No entanto, a toxicidade é menor quando administrada via oral, isto se deve à dificuldade de atravessar a membrana intestinal para penetrar na corrente sanguínea. O efeito hemolítico no intestino é muito menor que no plasma. Portanto, a ingestão de elevadas quantidades pode causar irritação no epitélio intestinal e, se atingir a corrente sanguínea pelas lesões, pode produzir danos hepáticos, hemólise, falência respiratória e coma (Jorba, 2005).

Ações terapêuticas

Glicosídeos de triterpenóides e esteroidais, os quais são conhecidos como saponinas, são substâncias bioativas presentes em muitas plantas (Rao & Gurfinkel, 2000). Algumas saponinas derivadas de triterpenóides têm ação hipoglicemiante (Connolly & Hill, 2001).

Além da função hipoglicemiante, Thompson (1993) cita efeito protetor frente ao câncer de cólon e intestino em pequenas concentrações. Aumenta a produção de anticorpos e ligam-se ao colesterol proveniente da dieta, no intestino, impedindo que atinja a corrente sanguínea.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido nos Departamentos de Química (DQI) e de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.1 Preparo das farinhas dos feijões

As cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizadas foram ‘Valente’ (tegumento preto), carioca dos cultivares Pérola (tegumento bege com rajas marrons) e Majestoso (tegumento bege com rajas marrons), fornecidas pelo setor de Genética e Melhoramento de Plantas do Departamento de Biologia da UFLA, MG. O feijão-branco foi cultivado em Campo Belo, MG, e adquirido em supermercado local. O produto comercial (faseolamina[®]) foi adquirido em farmácia de manipulação local e obtido de fornecedor de matérias-primas autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Para a obtenção da farinha de feijão, os grãos com casca foram lavados com água destilada, secos em estufa com circulação de ar a 30°C até peso constante, sendo, em seguida, moídos em moinho de facas até a obtenção de uma farinha de granulação bem fina, em torno de 60 mesh e acondicionada em frascos hermeticamente fechados, ao abrigo da luz, até as análises.

3.2 Composição centesimal

3.2.1 Umidade

A umidade das farinhas foi determinada por aquecimento em estufa, em temperatura entre 100° a 105°C, até peso constante AOAC (2005). Os resultados foram expressos em g/100g de matéria seca (MS).

3.2.2 Proteína bruta

A proteína bruta foi determinada com base no conteúdo de nitrogênio total, dosado pelo método Kjeldahl AOAC (2005). Na digestão, a matéria orgânica é mineralizada pela ação do ácido sulfúrico, o carbono é liberado na forma de gás carbônico e o hidrogênio como água. O nitrogênio orgânico é fixado sob a forma de sal amoniacal (sulfato de amônio). Na mistura catalítica, o sulfato de cobre age como catalisador oxidante e o sulfato de potássio aumenta a temperatura de ebulição. Na destilação, a solução de hidróxido de sódio libera a amônia, que é condensada e recebida em solução de ácido bórico e solução de indicadores (vermelho de metila e verde de bromocresol). O destilado é, então, titulado com ácido clorídrico e o teor de nitrogênio da amostra é calculado. O fator 6,25 foi utilizado para a obtenção do teor de proteína bruta. Os resultados foram expressos g/100g MS.

3.2.3 Extrato etéreo

O processo foi baseado na extração de substâncias solúveis em éter etílico, utilizando o extrator contínuo tipo Soxhlet. Após a evaporação do solvente, o teor de extrato etéreo foi determinado por diferença de peso. Os resultados foram expressos em g/100g MS. AOAC (2005).

3.2.4 Cinzas

A determinação de cinzas foi realizada por incineração da amostra em forno tipo mufla, a 550°C, determinando-se gravimetricamente a quantidade de resíduo resultante. Os resultados foram expressos em g/100g MS. AOAC (2005).

3.2.5 Fibra bruta

Consta, fundamentalmente, de uma digestão em meio ácido (solução de ácido acético, ácido tricloroacético e ácido nítrico). Após a hidrólise ácida, o resíduo foi lavado com água destilada quente até a retirada total da acidez. Este tratamento remove as proteínas, os açúcares, a hemicelulose e as pectinas, ficando como resíduos apenas a celulose e a lignina insolúvel em ácido, além de material mineral. Na etapa seguinte, o cadinho foi levado à estufa por 24 horas e a quantidade de fibras foi determinada por diferença do peso do cadinho antes e após os tratamentos (Kamer & Ginkel, 1952). Os resultados foram expressos em g/100g MS.

3.3 Preparo dos extratos protéicos

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

3.4 Determinação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada no EB, após precipitação com ácido perclórico, de acordo com metodologia descrita por Bradford (1976). Este método é baseado na interação de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas com o corante coomassie brilliant blue BG-250. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (Compton & Jones, 1985). O produto da reação

de coloração azul-esverdeada é lido em espectrofotômetro a 595nm, utilizando albumina sérica bovina como padrão.

3.5 Precipitação do extrato protéico bruto com ácido perclórico

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

3.6 Inibição das enzimas digestivas

Em cada determinação da atividade enzimática residual, a mistura da reação foi incubada por, pelo menos, quatro diferentes períodos de tempo. Controles sem enzima (branco de substrato), sem substrato (branco de enzima) e o branco amostra foram incubados do mesmo modo que os demais tubos experimentais e todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

3.6.1 Inibição de tripsina

Para a determinação da atividade de tripsina na presença e na ausência dos EB (inibidores), utilizou-se o método proposto por Erlanger et al. (1961) utilizando o N-benzoil-D,L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), preparado em tampão TRIS (trihidroximetilaminometano) 0,05 mol.L⁻¹, pH 8,2, como substrato. A atividade de tripsina inibida (tripsina pancreática de suíno Merck – E.C. 3.4.21.4) foi determinada a partir da diferença entre a atividade na ausência (controle sem inibidor) e na presença do inibidor. Simultaneamente, foram realizados brancos, substituindo-se o substrato por seu respectivo solvente (branco de enzima), substituindo-se a enzima por seu respectivo solvente

(branco de substrato) e o substrato e a enzima por seus respectivos solventes (branco amostra).

Uma miliunidade (mU) de atividade trípica corresponde à formação de um nanomol de p-nitroanilida por minuto nas condições de ensaio.

Os resultados da inibição de tripsina foram expressos em UIT (unidade de inibição de tripsina), que corresponde ao desaparecimento de 1 nanomol de p-nitroanilida (mU), quando comparado com a atividade da tripsina na ausência do inibidor (controle) por miligrama de matéria seca e em atividade específica (UIT/mg de proteína).

3.6.2 Inibição de α -amilase

Para a determinação da atividade de α -amilase na presença e na ausência dos EB (inibidores), utilizou-se o método proposto por Noelting & Bernfeld (1948), no qual a solução de amido 1% foi utilizada como substrato preparada em tampão Tris 0,05mol.L⁻¹, pH 7,0 acrescido de NaCl 38mMol.L⁻¹ e CaCl₂ 0,1mMol.L⁻¹.

A atividade de amilase inibida foi determinada a partir da diferença entre a atividade na ausência (controle sem inibidor) e na presença do inibidor, após pré-incubação, por 20 minutos, a 37°C. Simultaneamente, foram preparados brancos, substituindo-se o substrato por seu respectivo solvente (branco de enzima), a enzima por seu respectivo solvente (branco de substrato) e o substrato e a enzima por seus respectivos solventes (branco amostra).

A atividade de α -amilase foi expressa em miliunidades (mU) que corresponde à formação de um nanomol de glicose por minuto nas condições de ensaio. 1 UIA (unidade de inibição de α -amilase) corresponde à inibição total de 10 UI de α -amilase.

Os resultados da inibição da α amilase foram expressos em UIA, que corresponde ao desaparecimento de 1 nanomol de glicose quando comparado

com a atividade da amilase na ausência do inibidor (controle) por miligrama de matéria seca e em atividade específica (UIA/mg de proteína).

3.7 Saponina

A saponina das farinhas dos feijões e da faseolamina foi extraída com etanol (0,25g de farinha em 5mL de etanol) sob agitação em agitador horizontal por 1 hora, à temperatura ambiente. Após centrifugação a 10.000xg por 10 minutos, uma alíquota de 0,4mL do sobrenadante foi retirada e evaporada em banho-maria. O teor de saponina foi determinado pela reação da saponina com o anisaldeído, em meio ácido, produzindo um composto colorido, cuja absorbância foi lida a 430nm. A digitonina foi utilizada como padrão (Baccou et al., 1977). Os resultados foram expressos em g/100g MS.

3.8 Atividade hemaglutinante

Para a determinação da atividade hemaglutinante nos diferentes EB, foi utilizada a metodologia descrita por Calderón de la Barca et al. (1985). As amostras em triplicatas foram diluídas com a solução salina 0,85% em tampão PBS 0,02M pH 7,4, em placa de microtitulação contendo 8 fileiras com 12 poços cada. Alíquotas de 100µL de amostra foram misturadas com igual volume de solução salina tamponada e submetidas a uma série de diluições na base 2 (2^0 , 2^1 , 2^2 , 2^3 , etc.). Em seguida, a amostra diluída foi incubada com 100µL de suspensão de hemácias a 2%, preparada conforme a Figura 6. Foram realizadas leituras da aglutinação das hemácias, visualmente, após 60 e 120 minutos. A atividade hemaglutinante foi determinada pela maior diluição que ainda apresentava aglutinação visível das hemácias. Os poços que continham somente a suspensão de eritrócitos serviram como controle negativo.

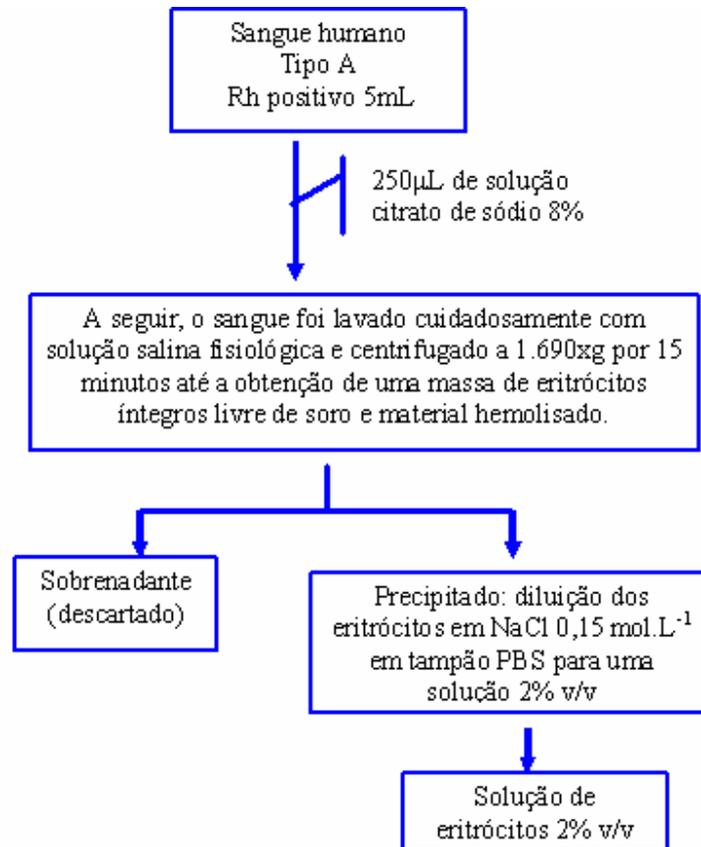


FIGURA 6. Preparo da solução de eritrócitos humanos.

Os resultados foram expressos em número de unidades hemaglutinantes (UH), que é calculado a partir do inverso do título da maior diluição que apresentou aglutinação visível. Por exemplo: considerando uma diluição 2^4 , o seu título igual a $1/16$ e o volume de amostra utilizado no ensaio de $100\mu\text{L}$, define-se que a atividade hemaglutinante será de $16 \text{ UH}/100 \mu\text{L}$ (Kilpatrick & Yeoman, 1978).

3.9 Inativação térmica

A inativação térmica dos inibidores de amilase e de tripsina foi determinada incubando-se alíquotas de EB, por 20 minutos, em banho-maria, a 95°C. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram resfriadas e realizada eletroforese nativa em cilindro de gel de poliacrilamida. Eletroforese de amostras sem tratamento térmico foi utilizada para comparação.

3.9.1 Eletroforese

Preparou-se um gel de poliacrilamida 7,5%, segundo Hedrick & Smith (1968). As amostras de diferentes preparações (fervidas e não fervidas) foram aplicadas nos géis de poliacrilamida, em tubos de 5mm de diâmetro interno e 100mm de comprimento. A eletroforese foi realizada com uma corrente constante de 2,5mA por cilindro. Os géis foram fracionados com o auxílio de lâminas de aço, em frações de, aproximadamente, 2mm de comprimento. As frações permaneceram mergulhadas em água para eluição das proteínas overnight, a 4°C, antes de serem usadas para a revelação dos inibidores das enzimas digestivas.

Em cada tubo de ensaio contendo as frações, foram adicionados enzima e substrato e os ensaios foram realizados segundo Erlanger et al. (1961), para tripsina e Noelting & Bernfeld (1948), para amilase. Na ausência do inibidor, a reação da enzima com o substrato resulta em um produto colorido que absorve em 410nm (*p*-nitroanilida pela ação da tripsina) e 540nm (redução do DNS pela ação dos açúcares redutores liberados pela α -amilase). Na fração do gel em que o inibidor estiver presente, denota-se uma queda nos valores de absorbância resultante de diminuição da formação do composto colorido pela inativação da enzima.

3.10 Ensaio biológico

3.10.1 Local

No planejamento e na execução da pesquisa, foram obedecidas as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea).

O ambiente foi exclusivo para roedores e com baixo nível de ruído externo. A temperatura variou entre 22°C a 26°C e ritmo de luz e penumbra, num fotoperíodo de 12/12 horas. A ração utilizada foi própria para a espécie (Nuvilab CR1®). Água e alimentação foram deixados *ad libitum*. Os cuidados de higienização e alimentação foram diários e realizados por tratador único.

3.10.2 Animais

Foram utilizados 24 camundongos Balb-C machos, em fase de crescimento, pesando de 20 a 30 gramas, procedentes do biotério do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA. Antes do estudo, os animais permaneceram por, pelo menos, 2 semanas adaptando-se às condições do laboratório.

Os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente em três grupos, com oito animais por grupo, de modo que a diferença média dos pesos entre os grupos não excedesse a 5 gramas, conforme recomendação da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC).

3.10.3 Preparo da amostra administrada por gavagem

Cada grupo de camundongos constituiu os seguintes tratamentos: controle (recebendo água destilada), faseolamina (recebendo extrato de faseolamina na proporção de 1g/70 kg/dia) e feijão-branco (recebendo extrato de feijão-branco 1g/70 kg/dia).

Calculou-se o peso médio do grupo. Para a definição do volume utilizado na gavagem, considerando que são preconizados 10 μ L/g de peso do camundongo. A farinha de feijão-branco e a faseolamina foram pesadas e diluídas em água destilada. A mistura foi submetida à agitação constante por 1 hora, à temperatura ambiente. Decorrido o tempo, o material foi filtrado em tecido de organza e centrifugado a 10.000xg, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi congelado em eppendorfs contendo volume suficiente para 1 dia de tratamento. Os extratos foram descongelados no momento da gavagem e administrados em temperatura ambiente.

3.10.4 Procedimentos

Os extratos de feijão-branco, faseolamina e água destilada foram administrados via oral por gavagem, que consiste na introdução de uma cânula metálica, de diâmetro de 3 mm, ligada a uma seringa, por meio do esôfago do animal. Para a verificação de efeitos subcrônicos, camundongos receberam extrato de feijão e faseolamina uma vez ao dia, por um período de 24 dias. Simultaneamente aos grupos tratados com extratos de feijão-branco e faseolamina, um grupo de camundongos recebeu água destilada como controle.

Durante todo o experimento, realizou-se, em dias intercalados, o controle do peso corporal dos animais para a elaboração da curva de crescimento. O peso corporal foi aferido em balança de precisão, sendo a variação de peso utilizada para avaliar o crescimento e o desenvolvimento dos animais.

Ao término do experimento, os animais foram deixados em jejum por cerca de 12 horas e, em seguida, foram anestesiados com éter etílico por inalação em câmara fechada.

Foi feita uma incisão na linha mediana. Após a abertura da cavidade peritoneal, foram afastadas as vísceras e o sangue foi puncionado dos grandes

vasos abdominais e, em seguida, centrifugado para a obtenção do soro, que foi analisado quanto à função hepática por meio da atividade de alanina-aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), utilizando o equipamento Labmax 240, método cinético UV IFCC. Para a avaliação da função pancreática, a amilase sérica foi determinada. Utilizou-se o equipamento Labmax 240, método substrato direto para determinação de amilase.

Imediatamente após a colheita do sangue, o fígado e o intestino delgado foram retirados, lavados em solução salina 0,9% e pesados para a obtenção do peso relativo. O processo de eutanásia dos animais foi feito por exsanguinação.

3.11 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com três tratamentos (controle, extrato de feijão-branco e extrato de faseolamina) e 8 repetições. Para o tratamento dos dados, foi feita análise de variância e, para a comparação das médias, foi empregado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição centesimal

Os teores de umidade nas amostras, em g/100g, foram os seguintes: faseolamina: 8,8; Branco: 7,12; ‘Pérola’: 8,92 e ‘Majestoso’: 9,07; ‘Valente’: 8,20. Na Tabela 3 são apresentados os resultados da composição centesimal das farinhas dos feijões e da Faseolamina.

TABELA 3. Composição centesimal, em g/100g de matéria seca, das farinhas de feijão e faseolamina.

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

Valores apresentados como a média e o desvio padrão da média de três repetições.

Os valores apresentados na Tabela 1 mostram que nenhuma das farinhas, inclusive a faseolamina comercial, foge à composição centesimal típica, já descrita para grãos de feijão, seja pelo conteúdo protéico e de cinza, pelos baixos valores dos extratos etéreos ou para os valores relativamente altos de carboidratos (ENN), concordando com os reportados nas revisões de Zucas et

al. (1971) e de Tobin & Carpenter (1978). Os dados da composição centesimal das farinhas de feijão do presente trabalho são semelhantes aos citados por Durigan (1985), cujos teores, em g/100g de matéria seca (MS), variam de 23 a 29, para proteína; extrato etéreo, de 1,03 a 1,59; carboidratos, de 57,4 a 69,7 e cinzas, de 3,67 a 5,11.

A faseolamina é comercializada como uma glicoproteína extraída do feijão-branco com efeito inibidor da α -amilase. Comparando mais especificamente a faseolamina, obtida segundo o fabricante, a partir do feijão-branco, com a farinha de feijão-branco preparada neste experimento, observa-se apenas uma pequena diminuição no teor de cinzas e de fibra bruta na faseolamina. Talvez, esta diferença possa ser atribuída ao fato de que diferentes cultivares foram utilizadas na preparação da faseolamina e da farinha de feijão-branco.

Esta mesma tabela mostra algumas diferenças entre as cultivares analisadas, como, por exemplo, a maior teor de extrato etéreo da cultivar pérola. Apesar disso, existem muito mais semelhanças entre a faseolamina e a farinha de feijão-branco, o que permite sugerir que, no produto comercial, o α AI não está purificado.

4.2 Atividade antitriptica e antiamilásica “in vitro” dos extratos protéicos brutos das farinhas de feijões e da faseolamina.

A inibição de tripsina e de amilase em níveis elevados pode ocasionar diminuição do crescimento e hipertrofia e hiperplasia pancreáticas, justificando um estudo desta inibição.

Na Tabela 4 são mostrados os resultados da inibição da amilase e da tripsina. A faseolamina comercial apresentou atividade específica dos inibidores de tripsina e amilase semelhante à da farinha de feijão-branco. A presença do

inibidor de tripsina sugere, como esperado, que a faseolamina seja um inibidor de α -amilase não purificado.

TABELA 4 Inibição de amilase e de tripsina nas farinhas dos feijões e na faseolamina.

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

Unidade de inibição de tripsina (UIT) e unidade de inibição de amilase (UIA): valores são a média e desvio padrão de três repetições.

A atividade específica de inibição de α -amilase encontrada para as farinhas dos feijões foi semelhante às descritas por Iguti (1988), cuja atividade específica variou de 110 a 300, para o feijão-preto; de 140 a 400, para o feijão-bege e de 140 a 330, para o feijão-branco.

A atividade inibitória de tripsina de cinco cultivares de feijões brasileiros (*Phaseolus vulgaris* L.), Carioca, Branco, Vermelho, Preto e Jalo, foi investigada por Jourdan et al. (2007). Não foram encontradas diferenças significativas nas quantidades de inibidor de tripsina entre variedades observadas. Nossas análises também mostraram atividades inibitórias semelhantes entre as cultivares e a faseolamina analisadas.

4.3 Antinutrientes

A constatação de que o inibidor de α -amilase não foi purificado levou à consideração da presença dos antinutrientes característicos do feijão. Os malefícios destas substâncias são conhecidos, porém, no preparo do feijão como alimento trivial na dieta brasileira, o cozimento por, aproximadamente, 30 minutos em panela de pressão, reduz ou até mesmo inativa a maioria destas substâncias.

O uso da farinha crua, no entanto, mesmo em pequenas proporções diárias implica na ingestão destas substâncias na sua forma ativa e possíveis danos devem ser avaliados. As saponinas são capazes de hidrolisar células, interferindo na absorção de nutrientes (Birk & Peri, 1980; Price et al., 1987; Thompson, 1993).

A lectina do feijão (PHA), em altas doses, induz à severa perda de peso, de lipídeo corporal, glicogênio e proteína muscular (Pusztai, 1991).

4.3.1 Saponina

Na Tabela 5 estão apresentados os teores médios de saponina nas farinhas de feijões e na faseolamina. Os teores de saponina da faseolamina e do feijão-branco são próximos, sugerindo, mais uma vez, que a faseolamina consiste apenas de uma farinha de feijão, sem purificação do inibidor de α -amilase.

TABELA 5. Teores médios de saponina nas farinhas dos feijões e na faseolamina.

Amostras	Saponina g/100g MS
Faseolamina	0,07 ±0,008
Branco	0,09±0,008
Pérola	0,10±0,0025
Majestoso	0,10±0,006
Valente	0,08±0,009

Valores são a média e desvio padrão de três repetições.

Os teores obtidos foram semelhantes aos encontrados por Ayet et al. (1996) que foi de 0,121g/100g em *Phaseolus vulgaris* var. Guerniquesa.

Ireland & Dziedzic (1987) encontraram teores de saponina de 0,075 a 0,149 g/100g MS, para farinha de feijão-vermelho (*Phaseolus vulgaris*). Muzquiz et al. (1999), analisando treze variedades de feijão cultivadas na Espanha, descreveram teores de saponina variando de 0,04 a 0,20 g/100g MS. Portanto, os teores de saponina determinados neste trabalho estão dentro da faixa citada na literatura.

4.3.2 Lectina

Observou-se que houve atividade hemaglutinante nas quatro variedades de feijão e também na faseolamina (Tabela 6), indicando, assim, a presença de lectina. Verificou-se também que a atividade hemaglutinante da faseolamina foi igual à do feijão-branco, semelhança já discutida anteriormente.

TABELA 6. Atividade hemaglutinante dos extratos protéicos brutos das farinhas dos feijões e da faseolamina.

Amostra	Atividade hemaglutinante (UH/100 μ L)
Faseolamina	512
Branco	512
Pérola	256
Majestoso	256
Valente	512

O valor expressa o inverso do título da maior diluição na base 2, em número de unidades hemaglutinantes (UH), em cada 100 μ L de amostra utilizados no ensaio com sangue humano tipo A Rh +.

Junqueira (1979) encontrou atividade hemaglutinante para feijão-rosinha G2 de 256 UH/100 μ L, conforme o obtido neste trabalho para as cultivares Majestoso e Pérola.

Apesar dos altos valores de atividade hemaglutinante encontrados, estes não podem ser relacionados com a toxicidade.

4.4 Inativação térmica

Os resultados dos constituintes químicos analisados foram praticamente iguais entre a faseolamina e a farinha de feijão-branco. Portanto, para realizar os estudos de inativação térmica e do ensaio biológico, o feijão-branco foi o escolhido.

Conhecendo-se as características químicas entre os inibidores de tripsina e amilase, o comportamento destes, a 95°C, foi observado na tentativa de obter uma inativação do inibidor de tripsina em detrimento da não inativação do inibidor de α -amilase. Isso seria de grande valia como uma alternativa massal e

econômica à utilização de colunas cromatográficas na purificação do inibidor de amilase.

4.4.1 Inibidor de α -amilase

Como se pode observar pelo ensaio de inibição de α -amilase nas frações dos géis de eletroforese (Figura 7), o α AI apresentou baixa estabilidade térmica, com perda total da inibição da α -amilase, a 95°C, por 20 minutos.

A inibição da amilase é relacionada com um decréscimo na absorbância nas frações do gel de poliacrilamida em que o inibidor estiver presente. Em B ocorre queda da absorbância entre as frações 11 e 17, indicando a presença do inibidor. Em A, pelo tratamento térmico e conseqüente desnaturação do inibidor, a absorbância é constante, ou seja, a amilase não foi inibida.

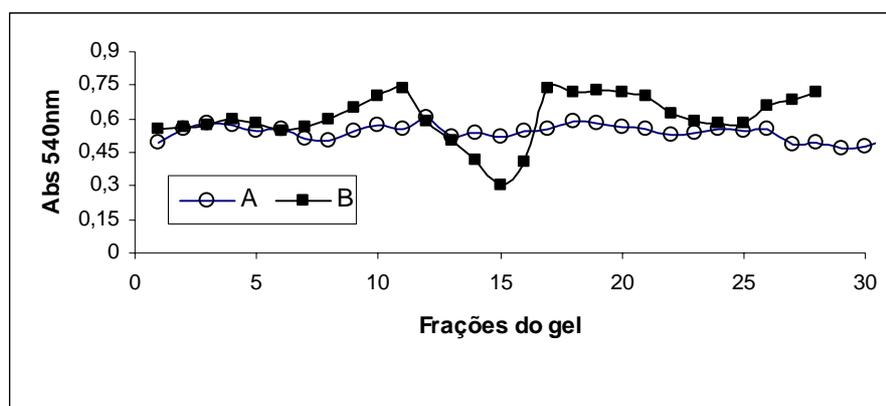


FIGURA 7. Inibição de α -amilase do extrato protéico bruto da farinha do feijão-branco.

A: com tratamento do extrato a 95°C por 20 minutos.

B: sem tratamento térmico.

Os resultados obtidos na eletroforese assemelham-se aos encontrados por Grant et al. (1995), que constataram uma inativação completa do inibidor de α -amilase de feijões kidney tratados a 100°C, por 5 minutos. Iguti (1988) obteve uma completa inativação do inibidor de α -amilase após 80 minutos de aquecimento, a 70°C, trabalhando com extrato bruto de feijão variedade manteiga 74.

4.4.2 Inibidor de tripsina

O inibidor de tripsina do extrato protéico bruto (EB) do feijão-branco apresentou alta estabilidade térmica (Figura 8). Esses resultados estão de acordo com Whitaker & Sgarbieri (1981) que, trabalhando com o inibidor de feijão ‘Rosinha G2’, constataram que este inibidor retinha 100% de sua atividade depois de um aquecimento, a 97°C, por 15 minutos e Fraekel-Contrat et al. (1952), que mostraram que os inibidores do feijão-de-lima eram estáveis ao aquecimento, a 90°C, por 15 minutos.

A inibição da tripsina é relacionada com uma queda na absorbância nas frações do gel em que o inibidor estiver presente. Ocorre queda da absorbância na fração 10 e posteriores, indicando a presença do inibidor antes e após o aquecimento.

A queda das leituras a 410 nm, nas frações correspondentes às amostras de EB de feijão-branco sem tratamento térmico e tratadas a 95°C, por 20 minutos, denotam a alta estabilidade térmica deste inibidor, que pode ser conferido pela estrutura compacta do inibidor de Bowman-Birk. Kumar et al. (2004), estudando o mecanismo molecular de dimerização dos inibidores de Bowman-Birk, descrevem que as sementes contêm múltiplas formas de inibidores do tipo Bowman-Birk: monômeros, dímeros, muitos inibidores associam-se para formar homodímeros, trímeros ou oligômeros mais complexos.

Sugeriram, então, que a forma dímera do inibidor é mais estável termicamente que a forma monômera.

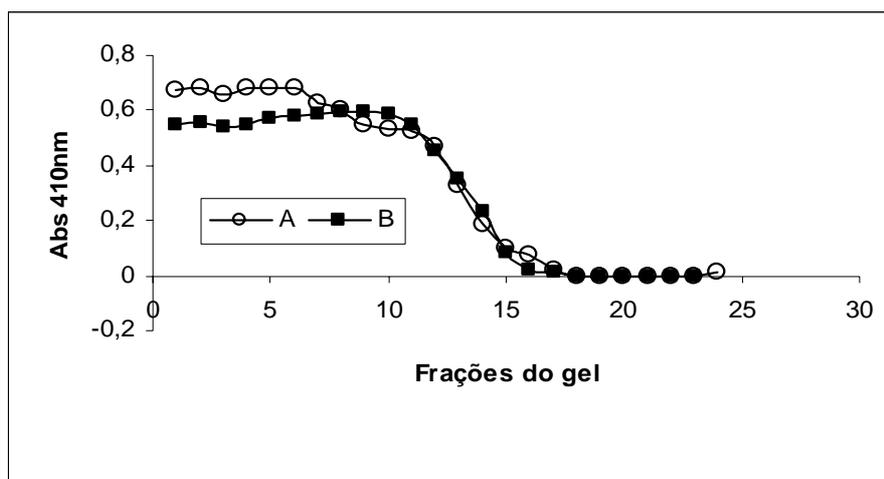


FIGURA 8. Inibição de tripsina pelo extrato protéico bruto da farinha do feijão-branco
A: com tratamento do extrato, a 95°C, por 20 minutos.
B: sem tratamento térmico.

O aquecimento tem se mostrado bastante eficiente para os grãos inteiros, mas com efeitos reduzidos ou mesmo ineficientes quando se trata da farinha ou de inibidores purificados (Rayas-Duarte et al.,1992). Carvalho & Sgarbieri (1997) e Ellenrieder et al. (1980) concluíram que componentes de alto peso molecular, separados dos extratos de soja por filtração em gel de Sephadex G-75, aceleraram a inativação térmica dos inibidores de tripsina. Segundo Tsukamoto et al. (1983), proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos provenientes do feijão são fatores inativantes, pela interação com os inibidores, e, de acordo com Galeazzi & Sgarbieri (1988), a ação do calor leva os inibidores

a se complexarem com os componentes do grão, não sendo, portanto, eliminados.

Genovese & Lajolo (2001) submeteram amostras de feijão ‘Carioca’ ao cozimento em água destilada, previamente deixadas de molho por 14 horas ou não. Os resultados mostraram que o tratamento térmico em temperaturas de autoclavagem mostrou-se mais eficiente que a 100°C, tendo 15 e 30 minutos em autoclave correspondido a 1 hora a 100°C. Em geral, observou-se maior inativação nos feijões deixados de molho. Dessa forma, ainda não existe consenso em relação às condições de aquecimento mais adequadas para a inativação dos inibidores de tripsina.

A eletroforese mostrou que o inibidor de tripsina foi estável ao tratamento térmico, enquanto o inibidor de α -amilase foi desnaturado. Sendo assim, o tratamento térmico aplicado com o objetivo de desnaturar o inibidor de tripsina e preservar o inibidor de α -amilase não foi eficiente.

Altos valores de atividade inibitória residual encontrados para feijões submetidos a tratamento térmico, segundo Genovese & Lajolo (2001), indicaram que estes poderiam ser decorrentes de artifícios da metodologia utilizada e não da inibição específica. Os resultados obtidos na eletroforese confirmam a alta atividade residual do inibidor de tripsina encontrado “in vitro”. Sendo assim, trata-se de uma inibição específica verdadeira e não de artefatos na metodologia.

4.5 Ensaio biológico

O ensaio biológico foi realizado com o objetivo de avaliar consequências do uso da farinha de feijão cru, dada a presença de fatores antinutricionais com efeitos deletérios conhecidos.

A dose recomendada para exercer efeito hipoglicemiante e emagrecedor de inibidor de α -amilase para humanos é de 250 a 1.000mg de faseolamina/dia. A dose utilizada no experimento foi de 1.000mg/70 kg/dia.

4.5.1 Avaliação do crescimento

A curva de crescimento dos animais é demonstrada na Figura 9, na qual se pode observar que houve ganho de peso nos animais durante os 24 dias para a faseolamina, feijão-branco e controle, respectivamente. Não houve alterações significativas no crescimento e no desenvolvimento dos camundongos, após 24 dias recebendo o extrato da farinha de feijão-branco e da faseolamina, quando comparadas com o grupo controle (Tabela 1A do anexo)

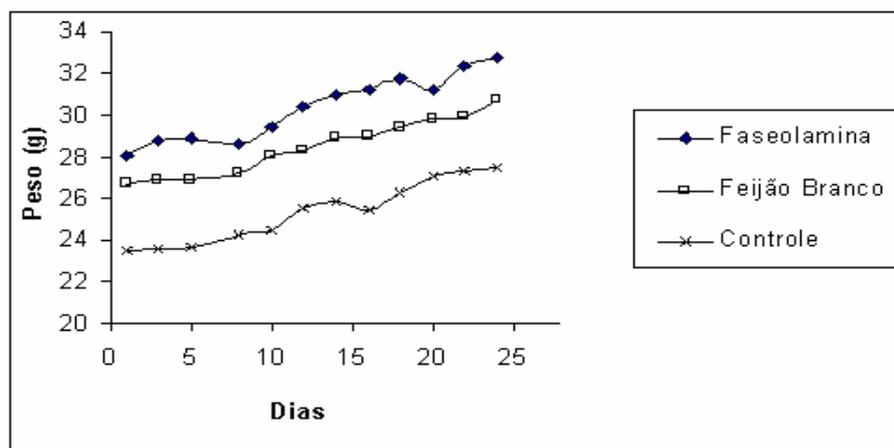


FIGURA 9. Curva de crescimento de camundongos Balb C tratados com extrato de faseolamina, de feijão-branco e controle.

O ganho de peso observado na Tabela 7 foi estatisticamente igual para os três grupos de camundongos que receberam extrato de faseolamina, extrato de feijão-branco e água (controle). A ausência de letalidade ou, mesmo, de perda de peso dos camundongos observada neste experimento pode estar relacionada com a dose.

TABELA 7. Ganho médio de peso dos camundongos em 24 dias recebendo extrato de faseolamina e extrato de feijão-branco.

Tratamentos	Gramas/ 24 dias
Faseolamina	4,54
Feijão-branco	4,03
Controle	4,26

Médias na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

As pesquisas dos fatores antinutricionais apresentam resultados conflitantes, do ponto de vista fisiológico. Os efeitos podem ser deletérios ou de relevância terapêutica. Estas variações podem estar relacionadas à dose, ao grau de pureza da amostra e à biodisponibilidade das substâncias, bem como aos fatores individuais, como características genéticas e presença de doenças associadas.

Segundo Pusztai (1995), o inibidor de α amilase (α AII) afeta seriamente a performance nutricional e o metabolismo em ratos. Contudo, estes efeitos estão altamente relacionados com outros fatores, como a pureza, a preparação, a dose e o tempo de exposição ao inibidor.

Segundo Pusztai et al. (1998), a inclusão de α AII na dieta de ratos Zucker obesos, particularmente em ingestão diária de 20 e 40 mg de inibidor/rato, diminuiu significativamente o crescimento dos animais. O conteúdo lipídico corporal foi altamente reduzido nestes ratos, talvez resultante de alterações no metabolismo lipídico.

Vale ressaltar que o período de suplementação utilizado por este autor foi superior ao empregado neste trabalho, o que pode justificar os valores de redução de gordura corporal e, também, que os modelos experimentais utilizados

são caracterizados por acúmulo de gordura visceral e uma leve obesidade, diferentemente dos animais deste estudo.

Bardocz et al. (1996), verificaram que, abaixo de 0,2g/kg de fito-hemaglutinina (lectina), os efeitos antinutritivos em ratos com microflora intestinal normal foram ligeiros no critério simples de redução de peso corporal, que foi mínimo após uma exposição de 10 dias. Antunes et al. (1995), verificaram, “in vivo”, que a toxicidade de feijões *Phaseolus vulgaris*, cultivares Rico 23, Carioca, Piratã-1 e Rosinha-G2 foi extremamente elevada, provocando letalidade total dos ratos alimentados com dieta à base feijão cru, num intervalo de 2 a 9 dias.

Lin & Liu (1986), determinaram valores de DL₅₀ de lectina de feijão (1.100 e 1.120 mg/kg de peso corporal, para ratos machos e fêmeas, respectivamente) e, em comparação com outros vegetais, como a mamona, em que a DL₅₀ é 0,028 mg/kg, conclui-se que a lectina do feijão tem toxicidade relativamente baixa.

A introdução de lectina de tepari em ratos produziu diferentes números de mortes em machos e fêmeas. A média da dose aguda letal (DL₅₀) foi similar em ambos os sexos: 1.100 mg de lectina/kg, para machos e 1.120 mg de lectina/kg de peso corporal, para fêmeas Camacho (2003).

A dose letal média (DL₅₀) para saponina encontrada por Diwan et al. (2000) foi de 200mg/kg peso corporal.

Como foi administrado 1g do extrato/70kg/dia (dose recomendada pelo fornecedor para o inibidor de α -amilase e usualmente utilizada), os valores de DL₅₀ para os antinutrientes não foram atingidos.

Uma análise mais minuciosa faz-se necessária, visto que o uso crônico por longos períodos pode ocasionar efeitos deletérios gradativos.

4.5.2 Avaliação da função hepática e pancreática

4.5.2.1 Parâmetros bioquímicos

As enzimas hepáticas costumeiramente incluídas nos perfis de triagem bioquímica sérica são alanina-aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) (Duncan, 1982; Ferreira Neto & Viana, 1978; Meyer et al., 1995).

A elevação dos níveis sérico-enzimáticos atribuída à disfunção hepática pode ser decorrente da ruptura dos hepatócitos, resultantes de necrose ou das alterações na permeabilidade da membrana celular (Kaneko, 1989).

Lesões ou destruição das células hepáticas liberam as transaminases para a circulação. A ALT (TGP) é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST (TGO) está presente na mitocôndria. Esta diferença tem auxiliado no diagnóstico e no prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve, a forma predominante no soro é citoplasmática, enquanto que, em lesões graves, há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (Motta, 2000).

A α -amilase está presente em vários tecidos (glândulas salivares, cérebro, pulmão), mas em maior quantidade no pâncreas e duodeno. A amilase tem uma alta especificidade para lesão pancreática. A hiperamilasemia pode ser indicativa de danos nas células acinais do pâncreas ou de obstrução do ducto pancreático. A hipoamilasemia pode ser decorrente da redução da liberação de amilase, metabolismo aumentado ou presença de substâncias inibitórias de amilase na circulação (Brobst, 1997).

Os parâmetros bioquímicos utilizados levaram em consideração a ação dos antinutrientes e a possível lesão do fígado e do pâncreas pela ação destes.

Com base nos dados da Tabela 8, denota-se que os valores de AST, ALT e amilase foram estatisticamente iguais para os tratamentos aplicados aos

camundongos. Tal constatação sugere que não houve danos às funções hepática e pancreática, pelos parâmetros bioquímicos analisados. As enzimas ALT, AST e amilase foram normais em relação aos resultados dos camundongos controle.

TABELA 8. Índices bioquímicos dos camundongos após 24 dias recebendo extrato de faseolamina e extrato de feijão-branco.

Tratamentos	AST (U/L)	ALT (U/L)	Amilase (U/L)
Faseolamina	177,25	62,37	1915,62
Feijão-branco	237,12	58,37	1864,50
Controle	242,12	68,62	1716,37

4.5.2.2 Peso do fígado e intestino delgado + pâncreas

Os principais antinutrientes encontrados no feijão atuam, principalmente, nas células do intestino, do pâncreas e do fígado. O peso destes órgãos em animais tratados em relação aos não-tratados foi utilizado como parâmetro para verificação de alterações anatômicas.

Pelos dados da Tabela 9, verifica-se que os pesos do fígado, do intestino delgado e do pâncreas em relação ao peso corporal total foram estatisticamente iguais, comparando-se os animais que receberam faseolamina e feijão-branco e água (controle). Denota-se a ausência de efeito dos antinutrientes, possivelmente pelo reduzido período de tratamento e da dose administrada, que podem ter sido insuficientes para causar alterações anatômicas nestes tecidos.

TABELA 9. Relação entre o peso do fígado e do intestino delgado + pâncreas e o peso corporal de camundongos tratados com extrato de feijão-branco e faseolamina.

Grupos	Peso do fígado/ peso corporal (%)	Peso do intestino delgado + pâncreas/ Peso corporal (%)
Faseolamina	5,34	4,38
Feijão-branco	5,10	4,50
Controle	5,32	4,49

Peso dos órgãos representados em % do peso total do animal.

Tormo et al. (2004), administrando α AI por 21 dias a ratos Wistar observou diminuição do peso absoluto dos intestinos grosso e delgado e do fígado. Ao contrário, Pusztai et al. (1995), administrando diferentes doses de α AI extraído de feijão-branco (10, 20 e 40g/dia) a ratos Wistar observaram um significativo aumento no peso do intestino delgado com elevação pronunciada do peso do ceco. De acordo com estes autores, isto é claramente uma consequência da diminuição da quebra do amido da dieta no intestino delgado e seu acúmulo no ceco. Com relação ao fígado e ao pâncreas, seus pesos absolutos foram menores nos ratos tratados.

Diaz et al. (2004) estudaram o efeito do produto comercial inibidor de α -amilase na redução de peso em mulheres obesas, durante 5 meses. O produto não apresentou efeito na redução do peso, na composição corporal e nem nos níveis de colesterol sérico. A ausência de efeito, segundo os autores, pode ser porque quando o inibidor de amilase suprime por completo a atividade da enzima, outras enzimas, tais como a maltase, seriam capazes de desdobrar o amido em glicose. Discordamos desta hipótese. A maltase é uma exoenzima e, sendo assim, a digestão de um polissacarídeo, que é uma molécula grande,

ficaria prejudicada na ausência de uma endoenzima. Outra possível razão descrita pelo autor poderia relacionar-se com os valores de pH que prevalecem no intestino delgado, em torno de 7,2, em detrimento do pH ótimo de inibição, que é de 5,5, a 37°C. Este fato, isoladamente, também não justifica a ineficácia do produto, visto que foi utilizado pH 7,0 nas análises “in vitro” e observou-se inibição da enzima nestas condições. Por fim, eles também atribuem a ineficácia do produto à pureza do inibidor empregado. Com esta hipótese nós concordamos, pois, nas análises comparando a farinha de feijão com a amostra comercial, concluiu-se que esta não estava purificada.

5 CONCLUSÕES

A composição centesimal, a inibição de tripsina suína e de α -amilase pancreática suína e os antinutrientes da faseolamina foram semelhantes aos das farinhas de feijões, principalmente ao feijão-branco, o que sugere que não houve purificação do inibidor de α amilase na amostra comercial.

A tentativa de desnaturar os inibidores por desnaturação diferencial não foi efetiva, visto que o inibidor de amilase é bem mais instável que o de tripsina.

A dose de 1g de farinha de feijão-branco ou de faseolamina por 70kg de peso corporal/dia não afetou o crescimento e, aparentemente, não provocou efeitos deletérios aos camundongos tratados por 24 dias.

6 PERSPECTIVAS

Fazer o estudo histopatológico dos órgãos recolhidos para verificação de possíveis danos celulares.

Continuar a investigação da toxicidade aguda e crônica com ensaios biológicos, usando concentrações mais elevadas do extrato bruto e de frações isoladas dos feijões.

Testar doses que tenham efeitos na redução da hiperglicemia pós-prandial e verificar possíveis alterações fisiológicas decorrentes do uso de farinhas de feijões.

Purificar o inibidor de α -amilase por meio de metodologias massais como alternativa às colunas cromatográficas preconizadas, com o objetivo de obter um conteúdo economicamente viável e vantajoso.

Avaliar o uso do inibidor de α -amilase, utilizando ratos e camundongos diabéticos e obesos como modelos experimentais

Verificar possíveis alterações hematológicas (função hepática e pancreática) e histopatológicas decorrentes do uso crônico deste inibidor em diferentes concentrações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K.; KONDO, H. J.; ARAI, S. Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. **Agriculture Biology Chemistry**, Tokio, v. 51, n.10, p. 2763-2768, Mai. 1987.
- ALTABELLA, T.; CHRISPPEELS, M.J. Tobacco plants transformed with the bean alfaai gene express an inhibitor of insect alpha-amylase in their seeds. **Plant Physiology**, San Diego, v. 93, n. 2, p. 805-810, Jun.1990.
- ANTUNES, P. L. et al. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivares rico 23, carioca, piratã-1 e rosinha-G2. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 1, n. 1, jan./abr. 1995.
- ARAÚJO, L. M. B.; BRITTO, M. M. S.; CRUZ, T. R. P. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 509-519, 2000.
- ARDELT, W.; LASKOLWSKI JÚNIOR, M. Effect of single amino acid replacements on the thermodynamics of the reactive site peptide bond hydrolysis in ovomucoid third domain. **Journal of Molecular Biology**. Berkeley. v. 220, p.1045-1053, Aug. 1991.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 18. ed. Washington: 2005.
- AYET, G. et al. Determination of saponins in the main legumes cultivated in Spain. **Food Science and Technology International**, Washigton, v. 2, n. 2, p. 95-100, 1996.
- BACCOU, J. C.; LAMBERT, F.; SAUVAIRE, Y. Spectrometric method for the determination of total steroidal saponin. **The Analyst**, London, v. 102, p. 458-465, 1977.
- BARCA, A. M. C. de la; OCHOA, J. L.; VALENCIA, M. E.; Effect of the Extraction of a Hemagglutinin on the Nutritive Value of Amaranthus leucocarpus Seeds. **Journal of Food Science**, v. 50, n.6, p. 1700-1702, Nov. 1985.

BARDOCZ, S.; GRANT, G.; PUSZTAI, A. The effect of phytohaemagglutinin at different dietary concentrations on the growth, body composition and plasma insulin of the rat. **British Journal of Nutrition**, New York, v. 76, n. 4, p. 613-626, Oct. 1996.

BIRK Y.; PERI I. Saponins. In: LIENER, I. E. (Eds.). **En toxic constituents of plant foodstuffs**. New York: Academic, 1980. p. 161-182.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitor and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, v. 204, n. 2, p. 433-451, Mar. 1992.

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

BRAY, G. A. Obesity: historical development of scientific and cultural ideas. **International Journal of Obesity**, v. 14, n.11, p. 909-20, 1990.

BRESSANI, R.; ELIAS, L.G. Relación entre la digestibilidad y el valor proteínico del frijol común (*Phaseolus vulgaris*). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 34, n.1, p.189-197, 1984.

BRIGIDE, P. Disponibilidade de ferro em grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiados. 2002. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

BROEKAERT, W. F. et al. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. **Science**, v. 245, n. 4922, p. 1100-1102, Sep. 1989.

BROBST, D. F. Pancreatic function In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic, 1997. p. 353-368.

CALIXTO, F.S. et al. Formation of resistance starch in deproteinized and non-deproteinized beans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, p. 109-111, 1996.

CAMACHO, R. R.; MEJIA, E. G. de.; PINA, G. L. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 21-27, Jan. 2003.

CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; SILVA, F. C., Avaliação do aproveitamento de ferro em leguminosas por diálise “in vitro”. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 199, São Paulo. **Resumos**. São Paulo: SBAN. 1999. p. 258.

CARVALHO, M. R .B.; SGARBIERI, V. C. Heat treatment and inactivation of trypsin: chymotrypsin inhibitors and lectins from beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal Food Biochemistry**, Quebec, v. 21, n. 3, p. 219-233, 1997.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G.; Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, Glasgow, v. 38, n.30, p. 560-578, Jul. 2007.

CORREA, P. Epidemiological correlations between diet and cancer frequency. **Cancer Research**., Stanford, v. 41, p. 3685-3689, 1981.

DAMME, E. J. M. van. et al. Plant lectin: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia ,v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998

DIAZ, E.; AGUIRRE, C. P. ; GOTTELAND, R. M. Efecto de um inibitor de α amilasa sobre la reduccion de peso de mujeres obesas. **Revista Chilena de Nutricion**, Santiago, v. 31, n .3, 2004.

DIWAN, F. H.; ABDEL-HASSAN, I. A.: MOHAMMED, S.T. Effect of saponin on mortality and histopathological changes in mice. **Eastern Mediterranean Health Journal**, New York, v. 6, p. 345-351, 2000.

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1982. 217 p.

DURIGAN, J. F. Estudo da toxidez, composição e valor nutritivo das proteínas de cultivares brasileiros de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). 1985. 168 p. Tese (Doutorado Ciências dos Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ELLENRIEDER, G. ; GERONASO, H. ; BOJARSKI, A. B. de Thermal inactivation of trypsin inhibitors in aqueous extracts of soybeans, peanuts and kidney beans: presence of substances that accelerate inactivation. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 57, n. 1, p. 25-27, 1980.

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

Federação Latino-Americana de Sociedades de Obesidade. (1998). *Documento do Consenso Latino-Americano em Obesidade*. Santiago, Chile.

FENG, G. H *et al*; α -amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human α amylases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 5, p. 419-426, May. 1996.

FERREIRA NETO, J. M.; VIANA, E. S. **Patologia clínica veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo Brasil, 1978. 279 p.

FRAENKEL-CONRAT, H. et al. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from lima beans. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 37, p. 393-407, 1952.

FRANCO, O.L. et al; Resistência de plantas a insetos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 11, p. 36-40, 1999.

FRIZZAS, M.R.; CUNHA, U. S.; MACEDO, L.P. M. Plantas transgênicas resistentes a insetos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 1, p. 13-18, Jjan./Mar. 2004.

GALEAZZI, M. A. M.; SGARBIERI, V. C. Inactivation and reactivation of trypsin inhibitors in different bean varieties. In: ORGANIZATION OF THE AMERICAN STATES. **Advances in bean research: chemistry, nutrition, technology**. São Paulo : EDUSP, 1988. p. 15.

GARCIA-OLMEDO, S. F. et al. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and α -amylases. **Oxford Survey Plant Molecular and Cell Biology**, Chicago, v. 4, p. 275-334, 1987.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M., Atividade inibitória de tripsina do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): avaliação crítica dos métodos de determinação. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 51, 2001.

GOMES, C. E. M., Purificação, caracterização e atividade bioinseticida de um inibidor de tripsina de sementes de *Crotalaria pallida*. 2004. 74 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Universidade Federal do Rio grande do Norte, Natal.

GRANT, G.; EDWARDS, J. E.; PUSZTAI, A.. α - Amylase inhibitor levels in seeds generally available in Europe. **Journal of the Science of Food Agricultural**, Sussex, v. 67, n. 2, p. 235-238, Feb. 1995.

GROSSI DE SÁ, M. de F. G.; CHRISPEELS, M. J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) α amilases cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 4, p. 271-281, 1997.

GUPTA, Y. P. Antinutritional and toxic factors in food legumes: a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 37, n. 3, p. 201-208, 1987.

HANGEN, L. A.; ENNINK, M. R. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. **Nutrition and Câncer**, v. 44, p. 60-65, 2003.

HARO, M. I. et al. Chemical composition, dietary fiber and mineral content of frequently consumed foods in northwest Mexico. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 45, n.2, p. 145-150, 1995.

HATHCOCK, J. N. Residue trypsin inhibitor: data needs for risk assessment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 289, p. 273-279, 1991.

HEDRICK, J. L.; SMITH, A. J. Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc-gel eletrophoresis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 126, n.1, p.155-164, 1968.

IGUTI, A. M. **Isolamento e purificação de iso-inibidores de alfa-amilase em diferentes variedades de feijões (*Phaseolus vulgaris*)**. 1988. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

IRELAND, P. A.; DZIEDZIC, S. Z., Saponins and saponins of chick pea, haricot bean, and red kidney bean. **Food Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 105-116, 1987.

JANSEN, H. D. et al. Potentially defensive proteins in mature seeds of 59 species of tropical Leguminosae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 12, p. 1469-1480, 1986.

JORBA, C. G. **Estudio de factores no nutritivos en “*vicia faba I*”.: Influencia de la germinación sobre su valor nutritivo**, 2005. 270p. Tese (Doutorado em Nutrição e Bromatologia) – Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

JOUANIN, L. et al; Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v. 131, n. 1, p. 1-11, 1998.

JOURDAN, G.A.; NOREÑA, C.P.Z.; BRANDELLI, A. Inactivation of Trypsin Inhibitor Activity from Brazilian Varieties of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Science and Technology International**, Washington, v. 13, n. 3, p. 195-198, 2007.

JUNQUEIRA, R. G. **Purificação e propriedades de hemaglutininas de uma variedade brasileira de feijão *Phaseolus vulgaris*, L.** 1979. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

KAMER, S. B. van de; GINKEL, L. van. Rapid determination of crude fiber in cereals. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 19, n. 4, p. 239-251, 1952.

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

KASAHARA, K. et al. Complete sequence, subunit Structure, and complexes with pancreatic α -Amylase of an α -amylase Inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white Kidney beans. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 120, p.177-183, 1996.

KAVALALI, G. et al. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 241-245, Feb. 2003.

KEILOVA, H.; TOMASEK, V. Naturally occurring inhibitors of intracellular proteinases. *Acta biologica et medica Germanica, Alemanha*, v. 36, p. 1873-1881, 1977.

KILPATRICK, D. C.; YEOMAN, M. M. Purification of the Lectin from *Datura stramonium*. **Biochemical Journal**, London, v. 175, n. 3, p. 1151-1153, 1978.

KING, T. P. et al. Immunogold localization of ingested kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins in epithelial cells of the rat small intestine. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Seattle, v. 18, p. 413-420, 1986.

KLUH, I. et al. Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 66, n.1, p. 31-39, Jan. 2005.

KOEPKE, J. et al. Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 Å resolution. Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity **Journal of Molecular Biology**, v. 298, n. 3, p. 477-491, May. 2000.

KUMAR, P. et al. Molecular mechanism of dimerization of bowman-birk inhibitors, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 29, p. 30425-30432, 2004

LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; MENEZES, E. W. Qualidade Nutricional. In: ARAÚJO, R. S. et al. (Coords.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996. p. 71-99

LASKOLWSKI JÚNIOR, M. ; KATTO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 593-626, 1980.

LAYER, P.; CARLSON, G. L. ; DIMAGNO, E. P. Partially purified white bean amylase inhibitor reduces starch digestion in vitro and inactivates intraduodenal amylase in humans. **Gastroenterology**, New York, v. 88, p.1895-1902, 1985.

LAYER, P.; ZINSMEISTER, A.. R., DI MAGNO, E. P. Effects of decreasing intraluminal amylase activity on starch digestion and postprandial gastrointestinal function in humans. **Gastroenterology**, New York, v. 91, p. 41-48, 1986.

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

LIENER, I. E.; DONATUCCI, D. A.; TARCZA, J. C. Starch blockers: a potencial source of trypsin inhibitors and lectins. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 39, n.2, p. 196-200, Feb. 1984.

LIN, J. Y.; LIU, S.Y. Studies on the antitumor lectins isolated from the seeds of ricinus communis (castor bean). **Toxicon Journal**, Oxford, v. 24, n.8, p. 757–765, 1986.

MAENZ, D. D.; IRISH, G. G.; CLASSEN, H. L. Carbohydrate-binding and agglutinating lectins in raw and processed soybean meals. **Animal Feed Science and Technology**, Canada, v. 76, n. 3, p. 335-343, Jan. 1999.

MARES, M. et al. Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. **FEBS Letters**, v. 251, p. 94-98, 1989.

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

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinário: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995. 308 p.

MOKDAD, A. H. et al. The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998. **Journal of American Medical Association**, v. 282, n.16, p. 1519-1522, Oct. 1999.

MOREIRA, R.. A. et al. Plant Lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86 (sup 2), p.211-218, Oct. 1991.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. Porto Alegre: Médica Missau, 2000. 352p.

MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n.22, p. 6605-6611, Sep. 2002.

MUZQUIZ, M. et al. The investigation of antinutritional factors in *Phaseolus vulgaris*. Environmental and varietal differences. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, New York, v. 3, n. 4, p. 210–216, Jul. 1999.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 2, p. 121-142, abr./jun. 2005.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (Eds.). **Proteolytic enzymes: a practical approach**. New York: Oxford University, 1996. p. 1-14.

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

NONINO-BORGES, C. B.; BORGES, R. M.; SANTOS, J. E. dos. Tratamento clínico da obesidade. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 2 p. 246-252, Abr.-Jun. 2006.

NUMAO, S. et al. *In Situ* extension as an approach for Identifying novel - amylase inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 46, p. 48282–48291, Aug. 2004.

OLIVEIRA, M. F. et al., New enamine derivatives of lapachol and biological activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 74, n.2, p. 211-221, Jun. 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (WHO). **Commission on Health and the Environment. Report of panel on food and agriculture**, Geneva, 1992. (WHO/EHE/92.2). Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 13 jan. 2008.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Doenças crônico-degenerativas: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde**. Brasília; Organização Mundial da Saúde In: *Prevenção Integrada de Doenças Não Comunicáveis*, Genebra, nov. 2003. Disponível em <<http://www.fomezero.gov.br>> Acesso em: 13 jan. 2008.

PEUMANS, W. J.; DAMME, P. J. E. van. Lectin as plant defense proteins. **Plant physiology**, Stanford, v. 109, n. 2, p. 347-352, Oct. 1995.

PEUMANS, W. J.; DAMME, E. J. M. van. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, n. 4, p. 199-227, 1998.

PRICE, K. R.; JOHNSON, I. T.; FENWICK, G. R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuff. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 27-131, 1987.

PROLLA, I. R. D. **Características físico-químicas de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), e efeitos biológicos da fração fibra solúvel**. 2006. 114 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

PUSZTAI, A. Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): chemical composition, lectin content and nutritional value of selected cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, p. 843-848, 1979.

PUSZTAI, A. et al. Lipid accumulation in obese Zucker rats is reduced by inclusion of raw kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in the diet. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 79, p. 213-221, Aug. 1998.

PUSZTAI, A. **Plant lectins**. Cambridge: Cambridge University, 1991. 261p.

QIAN, M. et al. Molecular basis of the effects of chloride ion on the acid-base catalyst in the mechanism of pancreatic α -Amylase. **Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 3194-3201, Feb. 2005

RAO, A. V.; GURFINKEL, D. M. The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides. **Drug metabolism and drug interaction**, Londres, v. 17, n. 1, p. 211-235, 2000.

RAYAS-DUARTE, P.; BERGERON, D.; NIELSEN, S. S. Screening of heat-sable inhibitor trypsins in dry beans and their partial purification from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*) using anhydrotrypsin sepharose affinity chromatography. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 2, p. 32-42, 1992.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

ROBBERS J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLES, V.E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. 337 p.

- ROSENTHAL, G. A.; JANSEN, H. D. **Herbivores**: their interaction with secondary plant metabolites. New York: Academic, 1979. 718p.
- RÜDIGER, H. Plant lectins-more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica**, v. 161, n. 1, p. 130-152, 1998.
- RYAN, C. A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopatology**, v. 28, p. 425-449, Set. 1990.
- RYAN, C. A.; WALKER-SIMMONS, M. Plant proteinases. In: MARCUS, A. (Ed). **The biochemistry of plants**. New York: Academic, 1981. v. 6, p. 321-350, 1981.
- SANTIMONE, M. et al. Porcine pancreatic α -amylase inhibition by the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor (α -AI1) and structural changes in the α -amylase inhibitor complex. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, n. 2, p. 181-190, Fev. 2004.
- SATHE, S. K.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. Dry beans of *Phaseolus*: a review I chemical composition: proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 20, n. 1, p. 1-46, 1984.
- SCHEFFEL, R. S. et al. Prevalência de complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes melito do tipo 2 em atendimento ambulatorial. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 50, n. 3, p. 263-7, Jul-Sep. 2004.
- SCOTT, M. T.; GROSS-SAMPSON, M. ; BONFORD, R. Adjuvant activity of saponin: antigen localization studies. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, Suíça, v. 77, n. 4, p. 409-412, 1985.
- SHIVARAJ, B.; PATTABIRAMAN, T. N. Natural plant enzyme inhibitors: characterization of an unusual α -amylase/trypsin inhibitor from ragi (*Eleusine coracana* Gaertn.). **Journal of Biochemistry**, United Kingdom, v. 193, n. 1, p. 29-36, Sep. 1981.
- SOLER, O. **Biodiversidade, bioeconomia & fitoterapia**. 2000. 32 p. Tese (Doutorado em Ciências Sócio-Ambientais no Programa de Desenvolvimento do

Trópico Úmido – PDTU. Núcleo de Altos Estudos da Amazônia – NAEA) – Faculdade de Economia, Universidade Federal do Pará, Belém.

TANDON, O. B.; BRESSANI, R.; SCRMSHAW, N. S. Nutrients in central american beans. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. Washington, v.5, n. 2, p. 137, Feb. 1957.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Amsterdã, v. 109, n. 1, p.1-62, 1994.

THOMPSON, L. U. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Research International*, Ottawa, v. 26, n.2, p.131-149, 1993.

TOBIN, G ; CARPENTER, K. T. The nutritional value of the dry bean (*Phaseolus vulgaris*): A literature review. **Nutrition Abstracts and Reviews**, v. 48, n. 11, p. 919-936, 1978.

TORMO, M. A et al. Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an α -amylase inhibitor from White kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. **British Journal of Nutrition**, London, v. 92, n.5, p. 785-790, Nov. 2004.

TORMO, M. A et al. White bean amylase inhibitor administered orally reduces glycaemia in type 2 diabetic rats **British Journal of Nutrition**, London, v. 3, p. 539-44, Abr. 2006.

TOSCANO, C. M. As campanhas nacionais para detecção das doenças crônicas não-transmissíveis: diabetes e hipertensão arterial. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, p. 885-895, 2004.

TSUKAMOTO, I.; MIYOSHI, M.; HAMAGUCHI, Y. Purification and characterization of trypsin inhibitors from beans *Phaseolus vulgaris* 'Kintoki'. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 60, n.3, p. 281-286, 1983.

UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETS STUDY - UKPDS. Prospective Diabetes Study, VIII: study design, progress, and performance. **Diabetologia**, v. 34, p. 877-890, 1991.

VIEIRA, C. **O feijoeiro comum**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1967. 77 p.

WHITAKER, J. R. ; SGARBIERI, V. C. Purification and composition

of the trypsin-chymotrypsin inhibitors of *Phaseolus vulgaris* L. var Rosinha G2. **Journal of Food Biochemistry**, v. 5, n. 3, p. 197-213, 1981.

WU, W. et al. True protein digestibility and digestibility-corrected amino acid score of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 5, p. 1295-1298, 1995.

XAVIER-FILHO, J. **Sementes e suas defesas contra insetos**. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos. Organização dos Estados Americanos (OEA), p.1-31 Fortaleza: UFC, 1993.

YAMAMOTO, M. ; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. I. Purification and characterization of two soybean trypsin inhibitors. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 62, n.2, p. 141-149, 1967.

ZUCAS, S. M.; LOURENÇO, E. J.; CAMPOS, M. A. P. Os feijões: seu valor nutritivo e substâncias indesejáveis. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DO FEIJÃO, 1971, Campinas, 1971.

ANEXOS

ANEXO A

	Página
TABELA 1A Resumo da análise da variância do ganho de peso dos camundongos, após 24 dias recebendo extratos do feijão-branco e da faseolamina, na proporção de 1g/70kg/dia.....	72
TABELA 2A Resumo da análise da variância dos parâmetros bioquímicos séricos dos camundongos, após 24 dias recebendo extratos dos feijões e da faseolamina na proporção de 1g/70kg/dia.....	72
TABELA 3A Resumo da análise da variância do peso do intestino delgado, pâncreas e fígado dos grupos de 8 camundongos cada, tratados com faseolamina, feijão-branco e água.....	72

TABELA 1A. Resumo da análise da variância do ganho de peso dos camundongos, após 24 dias recebendo extratos do feijão-branco e da faseolamina, na proporção de 1g/70kg/dia.

FV	GL	QM _{ganho de peso}
Tratamentos	2	0,465 ^{ns}
Erro	24	0,208
C. variação (%) Média geral		10,67
		4,28

ns = não significativo, pelo teste de F, a de 5% de probabilidade.

TABELA 2A. Resumo da análise da variância dos parâmetros bioquímicos séricos dos camundongos, após 24 dias recebendo extratos dos feijões e da faseolamina na proporção de 1g/70kg/dia.

FV	GL	QM _{amilase}	QM _{ALT}	QM _{AST}
Tratamentos	2	85673,79 ^{ns}	213,50 ^{ns}	10425,04 ^{ns}
Erro	21	90042,75	100,98	5328,82
C. variação (%)		16,38	15,26	33,36
Média geral		1832,17	65,87	218,83

ns = não significativo, pelo teste de F, a de 5% de probabilidade.

TABELA 3A. Resumo da análise da variância do peso do intestino delgado, pâncreas e fígado dos grupos de 8 camundongos cada, tratados com faseolamina, feijão-branco e água.

FV	GL	QM _{fígado}	QM _{int delgado/pâncreas}
Tratamentos	2	0,053 ^{ns}	0,013 ^{ns}
Erro	24	0,15	0,72
C. variação (%)		7,38	19,03
Média geral		5,25	4,46

ns = não significativo, pelo teste de F, a 5% de probabilidade.