

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

DAIANE DOMINGUES DA SILVA

MERIANY PILON

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE EM
FARINHA DE FEIJÃO BRANCO**

**BAURU
2011**

**DAIANE DOMINGUES DA SILVA
MERIANY PILON**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE EM
FARINHA DE FEIJÃO BRANCO.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para a obtenção do título de Farmacêutico, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato.

BAURU
2011

**DAIANE DOMINGUES DA SILVA
MERIANY PILON**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE EM FARINHA DE
FEIJÃO BRANCO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para a obtenção do título Farmacêutico, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato.

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato.
Universidade Sagrado Coração

Prof^a Ms. Daniela Barbosa Nicolielo
Universidade Sagrado Coração

Prof^a Esp. Tatiana Alonso Lunardi Casoto
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 09 de dezembro de 2011

Dedicamos

Aos Nossos Pais esta conquista, com muito respeito, admiração, amor e nossa eterna gratidão pelo apoio em cada momento.

AGRADECIMENTOS

À Deus,
Pelo Dom da vida

À Prof^a. Dr^a. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato.
Pelos ensinamentos, total dedicação, incentivo, paciência e apoio no decorrer de todo o trabalho.

À Prof^a. Ms. Daniela Barbosa Nicolielo
Pela colaboração na parte prática e execução do trabalho

À Prof^a. Esp. Tatiana Alonso Lunardi Casoto
Pela amizade e colaboração na execução do trabalho

À Prof^a. Dr^a Dulce Helena Jardim Constantino
Pela colaboração na execução do trabalho

À Prof^a. Dr^a. Silvana Torosian Coradi
Pela colaboração em materiais

À Prof^o. Ms. Fernando Tozze Alves Neves
Pela colaboração em materiais e equipamentos do laboratório

À Rosa Maria de Oliveira Rosa
Pela “limpeza das vidrarias”

Laboratório de Química da USC
Laboratório de Biologia da USC

Tudo Posso Naquele Que Me Fortalece.
(Filipenses 4:13)

RESUMO

Uma das leguminosas mais pesquisadas da América Latina é o feijão comum *Phaseolus vulgaris L.*, pois constitui um dos mais importantes componentes do prato de vários países pobres e também do Brasil por apresentar-se como uma fonte de proteína na dieta e pelo seu custo baixo em relação à proteína animal. O feijão recebe destaque também pela sua infinidade de outros componentes nutricionais benéficos a saúde humana como carboidratos, cálcio, ferro e zinco, tornando-se uma importante ferramenta na alimentação diária. Porém, apesar de todos esses pontos positivos, esta leguminosa também apresenta alguns fatores limitantes, como o fator de flatulência e os componentes antinutricionais: inibidores proteases, taninos, fitatos e lectinas; que podem vir a interferir na sua qualidade nutricional. Como atualmente foi divulgado na mídia um modismo alimentar que faz uso da farinha de feijão branco para promover a perda de peso do indivíduo, sabendo-se dos riscos que estes fatores limitantes presentes no feijão podem causar. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade hemaglutinante de hemácias na farinha de feijão-branco, utilizando diferentes amostras comerciais coletadas na cidade de Bauru e São Paulo a fim de avaliar o risco causado as células sanguíneas ao fazer sua ingestão. As amostras de feijões, assim como as de farinha de feijão branco promoveram hemaglutinação de eritrócitos de rato, e portanto apresentam lectinas. A diferença entre a capacidade hemaglutinante das farinhas, variou entre 2,2 e 142,5 U.H/mg proteína, e pode ser atribuída ao método de fabricação que é desconhecido, bem como ao prazo de validade que em muitas das amostras é questionável, devido à precariedade no comércio: mercado e empório. É possível assim inferir que o ato de consumir a farinha de feijão branco pode ocasionar em efeitos fisiológicos prejudiciais ao sangue, além de provocar a ruptura das microvilosidades intestinais gerando uma má ou total inibição de absorção de nutrientes pelo intestino do indivíduo.

Palavras-chaves: 1. Lectinas. 2. Antinutricionais. 3. Leguminosas

ABSTRACT

One of the leguminous more researched in Latin America is the common bean *Phaseolus vulgaris* L., because it is one of the most important components of the dish of various poor countries and also in Brazil by presenting itself as a source of protein in the diet and by its low cost in relation to animal protein. THE beans receive emphasis also on his myriad of other nutritional components beneficial to human health as carbohydrates, calcium, iron and zinc, by becoming an important tool in daily diet. However, despite all these positive points, this leguminous also presents some limiting factors, such as the factor of flatulence and the componententes antinutritional: protease inhibitors, tannins, phytates and lectins; that may come to interfere in its nutritional quality. As currently was disclosed in the media a fad diet that makes use of the meal of white beans to promote the loss of weight of the individual, knowing of the risks that these limiting factors present in beans may cause; the objective of this work was to evaluate the hemagglutinating activity of red blood cells in the flour and beans-white, using different commercial samples collected in the city Bauru and Sao Paulo in order to assess the risk caused the blood cells to make their intake. The samples of beans, as well as the flour of white beans promoted hemagglutination of erythrocytes of rats, and therefore have present lectins. The difference between the capacity of hemagglutinating of the flours, between 2,2 and 142,5 U. H/mg of protein, can be attributed to the method of manufacture which is unknown, as well as to the validity of many of the samples is questionable, given the precarious in trade: market and emporium. We can thus infer that the act of consuming the flour of white beans may cause physiological effects harmful to the blood, in addition to causing the disruption of microvilli intestinal generating a bad or complete inhibition of nutrient absorption in the intestine of the individual.

Keywords: 1. Lectins. 2. Antinutritional. 3. Leguminous

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura1 - Composição nutricional do feijão branco.....	17
Figura 2 - Representação esquemática da ligação da lectina a um carboidrato.....	21
Figura 3 - Representação esquemática de aglutinação por lectinas.....	22
Figura 4 - Esquema das diluições.....	27
Figura 5 – Avaliação da atividade hemaglutinante.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de proteínas nas diferentes amostras de feijão e extrato.....	25
Tabela 2 – Atividade hemaglutinante em amostras de feijão.....	28
Tabela 3 – Atividade hemaglutinante em amostras de farinha de feijão branco.....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 DESENVOLVIMENTO	14
3.1 FEIJÃO	14
3.1.2 Feijão branco.....	15
3.2 FATORES ANTINUTRICIONAIS	18
3.2.1 Taninos	19
3.2.2 Fitatos	19
3.2.3 Inibidores de Proteases.....	20
3.2.4 Lectinas.....	20
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DE LECTINAS	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 MATERIAS.....	24
4.2 METODOLOGIA.....	24
4.2.1 Extração das proteínas.....	25
4.2.2 Preparo das Hemácias	26
5 RESULTADOS.....	28
6 CONCLUSÕES	31
REFERENCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

Segundo Pires et al. (2005), todas as espécies de feijão são compreendidas pelo gênero *Phaseolus*, sendo que a mais conhecida é a *Phaseolus vulgaris* L. a qual possui inúmeras variedades como, carioca, roxo, mulatinho, preto, branco, etc.

Os grãos de leguminosas ocupam grande destaque na nutrição humana, o feijão, leguminosa mais consumida na América Latina, desempenha um importantíssimo papel na alimentação diária.

O feijão fornece alguns nutrientes essenciais ao organismo, tais como proteínas, carboidratos, cálcio, ferro, magnésio, zinco e vitaminas; contendo também uma quantidade significativa de ácidos graxos insaturados (ácido linoléico) e fibra alimentar (especialmente a fibra solúvel). Todas essas propriedades fazem desse alimento um dos mais importantes constituintes da alimentação principalmente das populações de baixa renda (ANTUNES et al., 1995).

Embora este grão seja de muita importância e apresente inúmeros benefícios, não devemos esquecer que este também apresenta características que limitam sua aceitabilidade, como o fenômeno *hard to cook* e características indesejáveis, que são os fatores antinutricionais tais como inibidores de enzimas proteases, lectinas, polifenóis e fitatos (RAMÍREZ-CÁRDENAS; LEONEL; COSTA, 2008).

Estes fatores podem provocar efeitos fisiológicos adversos ou ainda diminuir a biodisponibilidade de certos nutrientes, por isso devem-se empregar os métodos de descascamento, maceração, cozimento, pois reduzem a ação dos mesmos.

Já os modismos alimentares, estão relacionados com a alimentação, prometem mais saúde ou perda de peso ao indivíduo, e assim costumam entrar e sair de moda constantemente. Um desses modismos é consumir a farinha de feijão branco, a qual ajudaria a emagrecer e reduzir os níveis de triglicerídeos do sangue.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor de lectina, que é um fator antinutricional, em farinha de feijão branco *Phaseolus vulgaris* L., em função do modismo atual que preconiza o emprego desta farinha como coadjuvante em regimes de emagrecimento.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de lectina e sua ação anticoagulante em farinha de feijão branco.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Levantamento bibliográfico e análise de diferentes amostras comerciais de farinha de feijão branco, bem como sementes de feijão branco, preto, jalo e favo.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 FEIJÃO

É uma leguminosa pertencente à classe Dicotyledoneae, família Leguminosae, subfamília Papilionoidae, gênero *Phaseolus* e espécie *Phaseolus vulgaris* L. A espécie mais cultivada é *Phaseolus vulgaris* L. responsável por 95% da produção mundial de feijões, sendo cultivada em aproximadamente 100 países, destacando-se a Índia, o Brasil, a China, os Estados Unidos e o México, dentre os quais o Brasil é o maior produtor, seguido pelo México (YOKOYAMA, 2002).

De acordo com a Sociedade Nacional de Agricultura (2006), o feijão é considerado como um dos alimentos básicos de diversos países do mundo, principalmente dos povos pobres; vindo a ser marca registrada da cozinha brasileira como o mais popular alimento tanto na zona urbana como na rural tornando-se assim o constituinte principal de fonte de proteína vegetal.

O teor proteico encontrado nas sementes varia entre 15 a 33% (RAMOS; MAGALHÃES; CALDAS, 2006), apesar disso, Moura e Canniatti-Brazaca (2006) ressaltam que em relação às proteínas do feijão, há certa deficiência de aminoácidos sulfurados metionina e cistina; porém esta deficiência pode vir a ser compensada ao suplementar a alimentação com qualquer outro alimento que contenha tais aminoácidos.

O feijão fornece de 10 a 20% dos nutrientes necessários para um adulto (BASSINELLO, 2001) e este possui um valor energético de aproximadamente 300 Kcal em 100g. (RAMOS; MAGALHÃES; CALDAS, 2006).

Outra propriedade benéfica do feijão é que este apresenta um elevado teor de lisina, carboidratos complexos; além de vitaminas do complexo B e ferro (MOURA; CANNIATTI-BRAZACA, 2006).

Mesmo com todas estas propriedades relevantes e uma grande utilização na alimentação diária, esta leguminosa também possui fatores limitantes que diminuem

e/ou interferem no seu valor nutricional podendo também ocasionar efeitos fisiológicos indesejáveis (SILVA; SILVA, 1999).

3.1.2 Feijão branco

Como já dito anteriormente, todas as espécies de feijão são compreendidas pelo gênero *Phaseolus*, sendo que a mais conhecida é a *Phaseolus vulgaris* L. a qual possui inúmeras variedades, dentre elas encontra-se o feijão branco (PIRES, et al., 2005).

O feijão branco também apresenta todas as características do feijão comum vindo a apresentar pontos positivos como componentes essenciais, vitaminas e minerais, mas também pontos negativos como os fatores de flatulência e outros mais prejudiciais como os antinutricionais (SILVA; SILVA, 2000).

Sabe-se ainda que o feijão branco possui uma proteína de reserva denominada faseolamina. Esta proteína ao ser ingerida inibe a digestão do carboidrato e retarda a absorção de açúcares no sangue. Contudo, a faseolamina só possui este efeito inibidor quando é utilizada crua, ou seja, quando consumida em forma de farinha.

Este dado talvez tenha sido o que alavancou um dos muitos modismos alimentares atuais, onde sugere-se a utilização da farinha do feijão branco como um agente emagrecedor.

3.1.2.1 Composição Nutricional

Existem várias tabelas brasileiras disponíveis para pesquisa como a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (Unicamp), a da Universidade de São Paulo (USP), mas nelas não há nenhuma informação específica sobre o feijão branco.

O projeto TACO é coordenado pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação da UNICAMP e com financiamento do Ministério da Saúde e Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome como uma forma de proporcionar dados de um grande número de nutrientes em alimentos nacionais e regionais obtidos por meio de amostragem representativa e análises realizadas por laboratórios com competência analítica comprovada por estudos interlaboratoriais, segundo critérios internacionais.

Há também o Projeto Integrado de Composição de Alimentos que é coordenado pelo Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP e BRASILFOODS (Rede Brasileira de Dados de Composição de Alimentos). A meta prioritária do Projeto é a divulgação de dados nacionais de qualidade em composição de alimentos, através da tabela brasileira de composição de alimentos da USP (TBCA-USP).

Uma das tabelas mais completas disponíveis é a da USDA, cujo objetivo é desenvolver métodos para adquirir, avaliar, compilar e divulgar dados de composição dos alimentos e suplementos dietéticos disponíveis nos Estados Unidos. A Figura 1 apresenta a composição nutricional completa do feijão branco.

Nutrientes	Unidade	Valor por 100 g
Relacionados		
Água	G	11.32
Calorias	Kcal	333
Proteínas	G	23.360001
Lípides totais (gordura)	G	0.85
Carboidratos, por diferença	G	60.27
Fibra total dietética	G	15.2
Cinzas	G	4.2
Minerais		
Cálcio, Ca	Mg	240
Ferro, Fe	Mg	10.44
Magnésio, Mg	Mg	190
Fósforo, P	Mg	301
Potássio, K	Mg	1795
Sódio, Na	Mg	16
Zinco, Zn	Mg	3.67
Cobre, Cu	Mg	0.984
Manganês, Mn	Mg	1.796
Selênio, Se	Mcg	12.8
Vitaminas		
Vitamina C, ácido ascórbico total	Mg	0
Tiamina	Mg	0.437
Riboflavina	Mg	0.146
Niacina	Mg	0.479
Ácido pantotênico	Mg	0.732
Vitamina B6	Mg	0.318
Folato total	Mcg	388
Vitamina B12	Mcg	0
Vitamina A	UI	0
Vitamina A, ERA	mcg_RAE	0
Lípides		
Ácidos graxos, total saturados	G	0.219
Ácidos graxos, total mono-insaturados	G	0.074
Ácidos graxos, total poli-insaturados	G	0.364
Colesterol	Mg	0

Figura 1 - Composição nutricional do feijão branco.
 Fonte: USDA Nutrient Database for Standard Reference (2001).

3.1.2.2 Farinha de feijão branco

A forma mais habitual do consumo do feijão branco é sob a forma de farinha. Esta pode ser obtida comercialmente ou ainda, ser feita em casa usando o próprio feijão branco pulverizado através do auxílio de um liquidificador ou um processador alimentar.

Esta forma de consumo (farinha) pode ser classificada como um exemplo de modismo alimentar, sendo que a mesma tornou-se mais conhecida e fortemente utilizada depois de ser exibida na mídia como um agente emagrecedor, graças ao seu poder de inibição da absorção de carboidratos.

A forma popular de consumo é encontrada em vários sites da internet (blogs) com a forma de preparo e uso como nesta “orientação” do site <http://ecobiosaude.blogspot.com/2011/06/farinha-de-feijao-branco.html>:

*Para preparar separe 250g de feijão branco cru, (quantidades menores podem causar acidentes com o liquidificador);
Lave bem e deixe secar no sol ou sobre o papel toalha (nunca no forno),
Triture no liquidificador até formar uma farinha, se quiser pode passar também no processador ficará bem fina, depois passe na peneira.
Meia hora antes das refeições (almoço e jantar) misture 1 colher de chá rasa desta farinha, em um pouco de água e beba. Não consuma mais do que 1g por dia, pois o excesso pode causar diarreia e não terá efeito.*

3.2 FATORES ANTINUTRICIONAIS

Embora as leguminosas possuam alto teor de proteínas, elas podem conter fatores antifisiológicos e outras substâncias prejudiciais à saúde, (PROLL et al., 1998); sendo estas inibidores das enzimas proteases, lectinas, taninos, fatores de flatulência, fitatos (VASCONCELOS et al., 1994).

Fatores antinutricionais são aqueles capazes de diminuir a importância nutricional de determinado alimento, provocando efeitos fisiológicos adversos ou ainda reduzindo a biodisponibilidade de alguns nutrientes (SILVA; SILVA, 2000).

Uma das maiores preocupações em relação aos riscos provocados por antinutrientes, além de seus danos à saúde, tem sido também, o desconhecimento dos níveis de tolerância, do grau de variação do risco individual e da influência de fatores ambientais sobre a capacidade de detoxificação do organismo humano diante dessas substâncias (SILVA; SILVA, 2000).

3.2.1 Taninos

Os polifenóis de leguminosas e cereais são predominantemente taninos de origem flavonóide (SILVA; SILVA, 1999).

Os taninos podem ser classificados como hidrolisáveis e não hidrolisáveis ou condensados. Os condensados estão presentes na fração fibra alimentar de diferentes alimentos e podem ser considerados indigeríveis ou pobremente digeríveis e também possuem efeitos adversos que interferem na cor, sabor e qualidade nutricional (BARTOLOMÉ et al., 1995).

Segundo Bressani et al. (1982) no processo de cozimento dos feijões nota-se que com um aumento da temperatura, os polifenóis podem ligar-se com algumas proteínas, e serem eliminados na água do cozimento, ou continuar livres, ou sofrer polimerização. As suposições indicadas foram de que os polifenóis livres podem influenciar indiretamente na digestão das proteínas por inibição da atividade enzimática. Durante o cozimento, os polifenóis podem penetrar no cotilédone e reagir com suas proteínas, tornando-as menos suscetíveis a hidrólise enzimática, e assim diminuir a sua biodisponibilidade.

3.2.2 Fitatos

Os fitatos estão inseridos em uma classe complexa de compostos, formados durante o processo de maturação de sementes e grãos de cereais (TORRE et al., 1991).

Nas sementes de leguminosas o ácido fítico tem aproximadamente 70% do conteúdo de fosfato, sendo estruturalmente ligados a proteínas e/ou minerais na forma

de complexos (ZHOU; ERDMAN,1995). Cerca de 75% do ácido fítico está associado com componentes da fibra solúvel presentes na semente (TORRE et al., 1991).

Segundo Khokhar et al. (1994), altos níveis de fitatos podem estar associados a efeitos nutricionais negativos ao homem, estando incluso em alimentos como leguminosas, formando altos complexos com cálcio, ferro, zinco e manganês (LONNERDAL, 1997).

3.2.3 Inibidores de Proteases

Um dos fatores associados a baixa digestibilidade das proteínas do feijão é a presença dos inibidores de proteases, e estes, na maioria das vezes são inativados durante o cozimento (EICHER; SATTERLEE, 1988).

Eles inibem a atividade das enzimas tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase, com isso reduzem o valor nutritivo das sementes e a disponibilidade dos aminoácidos. Os tipos de inibidores de proteases mais amplamente distribuídos são Bowman-Birk e Kunitz (BATISTA et al.,1996).

Observou-se que a inativação total do inibidor de tripsina foi obtida em feijões imersos em água limpa por uma noite e aquecidos em 97°C por 7,5 minutos (BONETT et al., 2007).

3.2.4 Lectinas

Estas moléculas foram descritas no final do século passado como proteínas de plantas com capacidade de aglutinação de hemácias. Assim, o primeiro relato ocorreu em 1888, onde Stilmark verificou que extratos tóxicos de *Ricinus communis* aglutinavam eritrócitos de animais de diferentes espécies pela presença de uma proteína conhecida como ricina; dando origem ao início das pesquisas com o uso de lectinas. Esses estudos, sobre estas proteínas, só se intensificaram e tornaram-se relevantes em 1960, com uma grande área de aplicação das lectinas. (KENNEDY et al., 1995).

Lectinas são representadas por uma classe de proteínas que tem a função de unir-se de forma reversível a fragmentos glicídicos, de glicoconjugados de natureza não imunológica, e recebem o nome de fitohemaglutininas por decorrência de seu efeito na

coagulação das hemácias, sendo usadas na identificação de alguns grupos sanguíneos humanos (LIERNER, 1994).

Segundo Sharon e Lis (1990), o termo *lectina* (originado do latim “*lectus*”, que significa selecionado) refere-se à habilidade dessas proteínas ligarem-se seletivamente e reversivelmente a carboidratos (Figura 2); através da superfície celular de seus sítios. (SANTOS, et al. 2005).

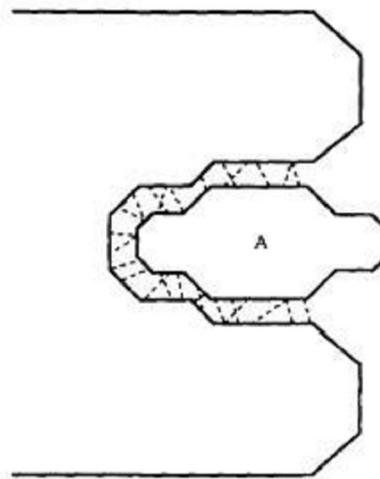


Figura 2 - Representação esquemática da ligação da lectina a um carboidrato (A). As linhas pontilhadas representam pontes de hidrogênio.

Fonte: Kennedy et al. (1995).

De acordo com Mody et al. (1995), as fitohemaglutininas estão amplamente difundidas, podendo ser encontradas em plantas, animais vertebrados, invertebrados e micro - organismos.

Quando administradas oralmente, as lectinas possuem um efeito tóxico que pode ser causado pela sua habilidade em ligar-se a receptores específicos das células epiteliais da parede intestinal. Estas ligações originam-se através de reações com as células intestinais "in vitro", que causam o rompimento de microvilosidades das células epiteliais do duodeno e do jejuno. Sendo esta, a explicação para o seu mecanismo de ação antinutricional.

Os possíveis efeitos adversos das lectinas em seres humanos se devem ao conhecimento de experimentos em animais de laboratórios. Com isso, a maior questão

e preocupação sobre os riscos à saúde provocados por antinutricionais é o fato de desconhecer o processo para a eliminação dessas substâncias consideradas prejudiciais ao organismo; além do desconhecimento da quantidade individual aceitável de ingestão.

A maior parte das lectinas pode ser inativada ou inibida quando utilizados tratamentos térmicos adequados, porém quando ingerida sob a forma crua, na farinha de feijão branco, essa inativação não ocorre, daí a grande preocupação em consumir esse alimento (SILVA, SILVA., 1999).

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DE LECTINAS

Podemos detectar a presença de lectinas em uma amostra através de ensaios de aglutinação (Figura 3), nos quais elas conseguem interagir com carboidratos da superfície celular através de seus sítios, formando diversas ligações reversíveis entre células opostas. As lectinas podem aglutinar diversos tipos de células, porém o ensaio mais utilizado é o de hemaglutinação que é realizado através de uma diluição seriada da amostra contendo lectina e de posterior incubação com eritrócitos. A rede que se forma entre os eritrócitos constitui o fenômeno de hemaglutinação. O inverso da maior diluição em que se observa a hemaglutinação corresponde à atividade hemaglutinante (SANTOS et al., 2005).

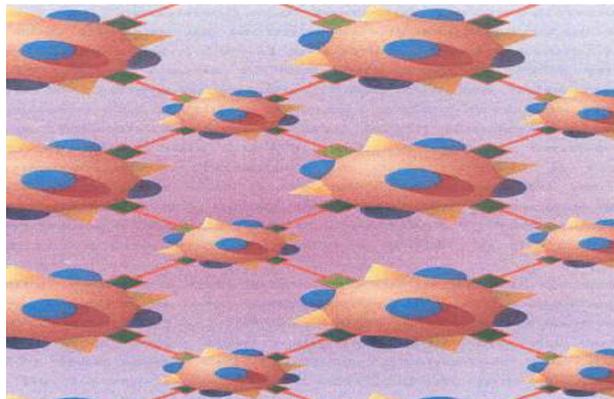


Figura 3- Representação esquemática de aglutinação por lectinas. Lectinas e seus ligantes de superfície da célula: carboidratos ou não-carboidratos, ligantes ou não.

Fonte: Kennedy et al.(1995).

Junqueira e Sgarbieri, 1981 propõem o uso de eritrócitos de coelho tripsinizados no teste de hemaglutinação, limpeza dos mesmos com solução salina tamponada. Para o teste em placa empregam 50 microlitros de amostra, de salina e de solução a 4% das hemácias.

Já Bariani et al., 2007 utilizaram hemácias de hamster e camundongo nos teste de hemaglutinação. As hemácias foram lavadas em NaCl (0,15 M) por quatro vezes (1000 x g, 4°C, 20 minutos), sendo a solução de hemácias a 2% empregada na avaliação. Os poços da placa, foram preenchidos com 50 µL de NaCl (0,15 M) e em seguida acrescidos 50 µL de extrato total, e 50 µL de solução de hemácias 2% .

Pando et al. 2002 e Chevreuil et al. 2009, sugerem o uso de hemácias de camundongo, hamster e rato branco, com idade de 2 a 3 meses, coletadas e homogeneizadas em solução anticoagulante (2,05% de glicose; 0,8% de citrato de sódio e 0,42% de NaCl, pH 6,1). Os eritrócitos devem lavados por quatro vezes com solução salina (NaCl 0,15 M, 10% p/v) a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C. A suspensão final deve conter eritrócitos a 2% (v/v). Para o ensaio de hemaglutinação 50 µL de solução salina, 50 µL dos extratos totais e 50 µL de suspensão de eritrócitos a 2%.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAS

Foram analisadas 8 amostras de farinha de feijão Branco adquiridas no comercial das cidades de Bauru e São Paulo. As análises foram executadas em duplicata.

Também foram analisadas amostras de feijões apenas moídos para um grupo controle, pois não há informação sobre o processo de produção das farinhas.

4.2 METODOLOGIA

A metodologia empregada para a avaliação da atividade hemaglutinante foi conforme as técnicas de Junqueira e Sgarbieri, 1981 com adaptações de PANDO et al. 2002, com pequenas modificações.

4.2.1 Extração das proteínas

As sementes inteiras Feijão Branco Fava, Feijão Branco Granel, Feijão Preto e Feijão Jalo foram trituradas, em moinho tipo martelo, até a obtenção de material pulverizado. Cerca de 5 g da amostra foi homogeneizada em 50 mL de solução salina (NaCl 0,15 M, 10 % p/v) durante duas horas à temperatura ambiente ($26 \pm 3^\circ\text{C}$), com agitação em *Shaker*. A suspensão foi centrifugada a $5000 \times g$ durante 20 minutos, o sobrenadante foi dialisado contra água destilada durante 33 horas, esta amostra foi mantida congelada até o momento da análise.

Para as farinhas comerciais empregou-se a mesma técnica de extração.

O teor de proteína total do dialisado foi calculado com base em valores de proteína da tabela USDA, USP e TACO, conforme a Tabela 1. A concentração de amostra no extrato foi de $0,1 \text{ g.mL}^{-1}$.

Tabela1 – Quantidade de proteínas nas diferentes amostras de feijão e extrato.

Amostra	% de proteína	Proteína g.mL^{-1} do extrato	Fonte
Feijão Branco Fava	24,9	0,025	Junqueira et al., 2010.
Feijão Branco	23,4	0,023	USDA, 2011.
Feijão Preto	23,5	0,023	TABELA USP, 2011
Feijão Jalo	20,1	0,020	TACO, 2011.
Farinha de Feijão branco	23,4	0,023	USDA, 2011.

4.2.2 Preparo das Hemácias

A) Coleta de Sangue

Amostras de sangue de animais saudáveis (camundongo), provenientes do biotério da Universidade do Sagrado Coração foram coletadas e homogeneizadas em solução anticoagulante.

O sangue de rato foi coletado em solução anticoagulante de ALSEVER, na proporção 1:1.

Anticoagulante ALSEVER

- Destrose – 4,10g
- Citrato de Sódio – 1,60g
- Acido Cítrico – 0,11g
- NaCl - 0,84g
- H₂O q.s.p - 200 mL.

A solução foi esterilizada pelo sistema de filtração *Millipore* e armazenada em frasco estéril, sob refrigeração, a fim de aumentar o tempo de vida útil do mesmo, bem como obter uma melhor conservação.

B) Lavagem das hemácias

Alíquotas de sangue foram centrifugadas a 3000 giros por 5 minutos para eliminação do plasma. As hemácias obtidas foram lavadas por 4 vezes com solução fisiológica 0,9%. Um teste preliminar foi feito com solução salina a 10% proposto por Pando et al. 2002, mas causou hemólise e foi substituída pela solução fisiológica a 0,9%. Vale ressaltar que a centrifugação foi feita em centrífuga normal e não refrigerada como as demais técnicas indicavam.

Após cada lavagem retirou-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta de 500µL. O precipitado foi ressuscendido em solução salina 10% de modo a obter uma suspensão final de eritrócitos a 2% (v/v).

C) Detecção de atividade hemaglutinante (AHE)

Foram utilizadas placas de aglutinação em acetato de celulose, com 96 reservatórios hemisféricos.

As soluções de proteínas em estudo (1 mg/ mL salina) foram sequencialmente diluídas obtendo-se 10 a 12 diluições (Figura 4).

Iniciou-se com aplicação de 25 µL da amostras no 1º reservatório, e 25 µL de solução salina nos outros reservatórios. Com o auxílio de uma micropipeta transferiu-se 25 µL da solução de um reservatório para o seguinte. Aplicou-se então 25 µL da solução de hemácias a 2%.

A placa foi deixada em repouso por 1 hora a temperatura ambiente, quando então foram agitadas em leves movimentos circulares. Após este tempo os resultados foram interpretados de tal forma que não apresentam mais aglutinação quando as células se levantam como um botão liso no fundo da placa.

1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a
res	res	res									
1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048

Figura 4 - Esquema das diluições

Fonte: JUNQUEIRA, R G; SGARBIERI, V. C ,1981.

A figura 5 exemplifica um dos testes efetuados. É importante ressaltar que cada etapa das leituras foi acompanhada de um controle negativo, o qual corresponde apenas à solução salina juntamente com a solução de hemácias e, portanto não deve apresentar hemaglutinação validando assim os demais resultados.

5 RESULTADOS

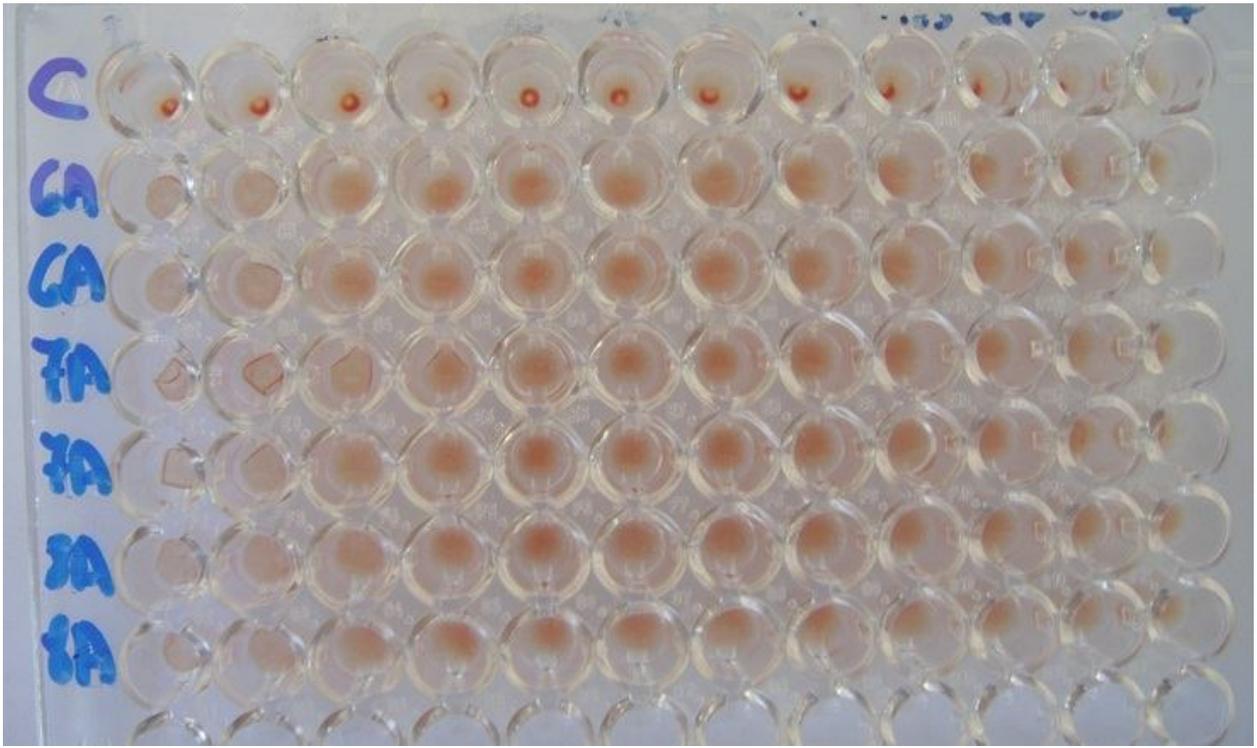


Figura 5 – Avaliação da atividade hemaglutinante.

C= controle e 6A, 7A, 8A são as amostras de farinha e sangue que sofreram aglutinação pela ação das lectinas.

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos para as amostras de feijão cru. As quatro espécies de feijão apresentaram valores diferentes de atividade hemaglutinante.

Tabela 2 – Atividade hemaglutinante em amostras de feijão.

Nº Amostra	Nome Amostra	U.H./mg amostra	Concentração protéica no teste	U.H./mg proteína
01	Feijão Branco Fava	0,4	0,625 mg	0,64
02	Feijão Branco	51,2	0,575mg	89,04
03	Feijão Preto	51,2	0,575mg	89,04
04	Feijão Jalo	409,6	0,500mg	819,20

U.H. – Atividade Hemaglutinante

Fonte: Elaborado pelas próprias autoras.

O feijão fava branco apresentou uma quantidade muito baixa de atividade hemaglutinante, e entre as amostras analisadas o maior valor foi para o feijão jalo.

Os valores de atividade hemaglutinante encontrado para as diferentes amostras de farinha de feijão branco são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 – Atividade hemaglutinante em amostras de farinha de feijão branco.

Nº	Nome Amostra	U.H./mg	Concentração	U.H./mg
Amostra		amostra	Protéica no teste	proteína
1A	Farinha Fina Feijão Branco- Flores & Ervas	409,6	0,585mg	700
2A	Farinha de Feijão Branco- Empório Rodrigues	819,2	0,585mg	1400
3A	Farinha de Feijão Branco – Empório Barres	12,8	0,585mg	22
4A	Farinha de Feijão Branco – Royal Supremo	25,6	0,585mg	44
5A	Farinha de Feijão Branco Mercado Municipal SP	204,0	0,585mg	349
6A	Farinha de Feijão Branco Mercado Municipal SP	819,2	0,585mg	1400
7A	Farinha de Feijão Branco Mercado Municipal SP	819,2	0,585mg	1400
8A	Farinha de Feijão Branco Mercado Municipal SP	819,2	0,585mg	1400

U.H. – Atividade Hemaglutinante

Fonte: Elaborado pelas próprias autoras.

Avaliando as amostras de farinhas comerciais, foi observado que grande parte delas apresentou uma forte atividade hemaglutinante, pois houve hemólise de hemácias praticamente até as últimas diluições da amostra, fato que pode ser evidenciado na figura 5, amostras 6A, 7A e 8A.

A diferença entre a capacidade hemaglutinante das farinhas, entre 2,2 e 142,5 U.H/mg proteína, pode ser atribuída ao método de fabricação que é desconhecido, bem como ao prazo de validade que em muitas das amostras é questionável, devido à precariedade no comércio: mercado e empório.

Vale ressaltar que a amostra 1A foi a única adquirida em Farmácia, com embalagem adequada às normas vigentes para alimentos. A farinha de feijão branco não é classificada pela ANVISA como alimento funcional.

6 CONCLUSÕES

As amostras de feijões assim como as de farinha de feijão branco promoveram hemaglutinação de eritrócitos de rato.

Considerando o alto índice de aglutinação dos glóbulos vermelhos pode-se afirmar que as amostras de farinha de feijão branco apresentam lectinas, que são as substâncias responsáveis por tal característica.

É possível assim inferir que o ato de consumir a farinha de feijão branco pode ocasionar efeitos fisiológicos prejudiciais a circulação sanguínea, pois ocasionam no surgimento de uma rede de hemácias interligadas, formando pequenos coágulos que são originados pela ligação entre as hemácias e as lectinas presentes na amostra. Ressalta-se ainda que, quando ingerida (farinha) em maior escala ou por longos períodos de tempos, podem provocar a ruptura das microvilosidades intestinais gerando uma má ou total inibição da absorção de nutrientes pelo intestino do indivíduo.

REFERENCIAS

ANTUNES, P.L. et al. Valor Nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*), cultivares rico 23, carioca, piratã-1 e rosinha-g2. **Revista Brasileira de Agriciência**, Pelotas, v.1, n.1, p.12-18, jan – abr 1995.

BARIANI, A. et al. Análise do perfil proteico e da atividade hemaglutinante no extrato total de semestres de *Peltogine venosa*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p. 207-209, jul. 2007.

BARTOLOMÉ, B.; JIMÉNEZ-RAMSEY, L. M.; BUTLER, L. G. Nature of the condensed tannins present in the fibre fractions in foods. **Food Chemistry**, Barking, v.53, n.4, p.357-362, 1995

BASSINELLO, P. P. Qualidade dos grãos. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, p. 1-3, 2001.

BATISTA, I.F.C., et al.; Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *enterolobium contortisiliquum* seeds. *Phytochemistry*, Oxford, v.41, n.4, p.1017-1022, 1996.

BONETT, L. P., BAUMGARTNER, M. S. T., KLEIN, A. C., SILVA, L. I. Compostos nutricionais e fatores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus Vulgaris* L.). **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 3, p. 235-246, set./dez. 2007.

BRESSANI, R., ELÍAS, L.G., BRAHAM, J.E. Reduction of digestibility of legume proteins by tannins. **Journal of Plant Foods**, London, v.4, n.1, p.43-55, 1982.

CHEVREUIL, L. R, et al. Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia. **Acta Amazonica**, v.39, n.1, p. 199 – 206, 2009.

ECOBIO produtos orgânicos. **Farinha de feijão branco**. Disponível em: <<http://ecobiosaude.blogspot.com/2011/06/farinha-de-feijao-branco.html>>. Acesso em 19 nov. 2011.

EICHER, N. J.; SATTERLEE, L. D. Nutritional quality of Great Northern bean proteins processed at varying pH. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 1139-1143, 1988.

JUNQUEIRA R.G.; SGARBIERI V.C. Isolation and general properties of lectins from the bean (*Phaseolus vulgaris*,L.). *Journal Food Biochemistry*, v. 5, p.165-179. 1981.

JUNQUEIRA, S. F.; OLIVEIRA,E. A.; MASCARENHAS, R. J.; PINTO DE MELO, B. V. **Caracterização físico-química da fava rajada (*Phaseolus lunatos* L.) cultivada no**

sertão paraibano. In: V Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica – CONNEPI. Maceió – AL. 2010.

KENNEDY, J.F et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, Birmingham, v. 26, p. 219-230, 1995.

KHOKHAR, S., PUSHPANJALI, FENWICK, G.R. Phytate content of indian foods and intakes by vegetarian indians of Hisar region , Haryana state. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v.42, n.11, p.2440-2444, 1994.

LIENER, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.34, n.1, p.31-67, 1994.

LONNERDAL, B. Effects of milk and milk components on calcium, magnesium, and trace element absorption during infancy. **Physiology Reviews**, v. 77, p. 643-669, 1997.

MESQUITA, F. R et al. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1114-1121, jul/ago.2007.

MODY, R.; JOSHI, S.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**,v. 33, n.1, p.1-10, 1995.

MOURA, A. C. de C. Análises físico-químicos e enzimáticas antes e após armazenamento em grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidos a diferentes tempos e tipos de secagem. 1998. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

MOURA, N. C. de; CANNIATTI – RAZACA, S. G, Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*phaseolus vulgaris*) em comparação com carne bovina. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**, São Paulo, v.26, p.270-276, abr./jun. 2006.

PANDO, S. C, et al. Análise do perfil protéico e da atividade hemaglutinante no extrato total de sementes de *Peltogyne venosa*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 207-209, jul. 2002.

PIRES, C. V et al., Composição físico-química de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 16, n. 2, p. 157-162, abr./jun. 2005.

PROLL, J. et al. Low nutritional quality of unconventional tropical crop seeds in rats. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 2014-2022, 1998.

RAMÍREZ-CÁRDENAS, L. R, LEONEL, A. J, COSTA, N. M. B, Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**, v. 28, p.200-213, jan./mar. 2008.

RAMOS, F; MAGALHÃES, I; CALDAS, H. Um dois... Feijão com arroz. **Eclética**, v.1, p. 54-56, jul./dez. 2006 RIBEIRO, H. J. S. S, PRUDENCIO-FERREIRA, S. H, MIYAGUI, D.T, Propriedades físicas e químicas de feijão comum preto, cultivar iapar 44, após envelhecimento acelerado. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**. v.25, p.165-169, jan/mar 2005. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/cta/v25n1/a26v25n1.pdf>. Acesso em 16 nov. 2011.

SANTOS, A. F. S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 39, p. 975–980, 2005.

SHARON, N.; LIS, H. Legumes lectins – a large family of homologous proteins. **Fasebj**, v. 4, p. 3198-3208, 1990

SILVA, M. R.; SILVA, A. A. P. da. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 5-19, 1999.

SILVA, M. R.; SILVA, A. A. P. da. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. *Revista de Nutrição, Campinas*, v. 13 n.1, p. 3-9, jan./abr., 2000.

TORRE, M. et al. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.1, n.1, p.1-22, 1991

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Disponível em <<http://www.unicamp.br/nepa/taco/>>. Acesso em 10 nov.11. [2011?]

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Tabela USDA. Disponível em <<http://www.unifesp.br/dis/servicos/nutri/nutri.php?id=4468>>. Acesso em 10 nov. 11.

VASCONCELOS, I. M. et al. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 312, p.357-366, 1994.

YOKOYAMA, L. P. Tendências de mercado e alternativas de comercialização do feijão. Santo Antonio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, Comunicado Técnico, n. 43, 2002.

ZHOU, J.R., ERDMAN, J.W. Phytic acid in health and disease. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.35, n.6, p.495-508, 1995. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8777015>. Acesso em 19 nov. 2011.