

PATRIZIA MELLO COELHO

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DA FARINHA DE FEIJÃO
BRANCO COMERCIAL EM MODELO MURINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C672a Coelho, Patrizia Mello, 1971-
2018 Avaliação da segurança da farinha de feijão branco em modelo
murino / Patrizia Mello Coelho. - Viçosa, MG, 2018.
vii, 28 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Lectinas. 2. Farinha de feijão branco. 3. Segurança alimentar. 4.
Toxicologia. 5. Alimentos - Toxicologia. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

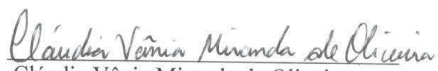
CDD 22. ed. 572.6

PATRIZIA MELLO COELHO

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DA FARINHA DE
FEIJÃO BRANCO COMERCIAL EM MODELO MURINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 10 de julho de 2018.


Cláudia Vânia Miranda de Oliveira


Manoela Maciel dos Santos Dias


Rodrigo de Barros Freitas


Michelle Dias de Oliveira Teixeira


Leandro Licursi de Oliveira
(Orientador)

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna

DEDICATÓRIA

Eu dedico este trabalho ao meu marido Valdir, que me ensinou a nunca fugir das dificuldades. Sem o empenho dele eu não teria dado os primeiros passos, esses sim, foram fundamentais para que eu estivesse vivendo agora estes momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e pelo privilégio de dedicá-la ao estudo e admiração de sua criação, e por me sustentar diante de todas as dificuldades e provações ao longo dessa caminhada.

Aos meus pais, Maria do Carmo e José Altivo, pelo cuidado e amor que tiveram ao dedicarem as suas vidas em função da minha.

Ao Valdir, pelo respeito, amor e companheirismo, especialmente nas horas difíceis.

Às minhas irmãs Cristiane, Daniela e Thays pelo carinho e conselhos.

Ao amigo, professor e orientador Leandro Licursi de Oliveira que abriu as portas do Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia (LIG) para que eu pudesse me aperfeiçoar enquanto profissional e ser humano. E por ter acreditado na minha capacidade de desenvolver esta pesquisa.

À amiga, professora e Co-orientadora Silvia Cardoso, por ter se esforçado até os últimos minutos para a realização deste trabalho, com carinho, profissionalismo e momentos de alegria.

Ao amigo e professor Sérgio Luis Pinto da Matta que abriu as portas do Laboratório de Biologia Estrutural para expandir meus conhecimentos e minha formação profissional. Além claro, das conversas descontraídas nos momentos do “cafezinho”!

À Professora Cláudia, por aceitar participar da banca, pelo tempo disponibilizado na correção deste trabalho, e principalmente pela ajuda sempre incondicional ao longo desses quatro anos de pós-graduação.

Às professoras Michele, Manoela e ao pós-doc Rodrigo, pelas importantes contribuições neste trabalho e por aceitar participar desta banca.

Aos amigos Graziela, Jerusa, Viviane, Alessandra, Christiane e Wendel que muito me auxiliaram durante a realização dos trabalhos.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural e ao Instituto Federal Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba pela oportunidade de realização do curso.

Aos professores da Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral, em especial Beth, muito obrigada!

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS.....	3
3. ARTIGO: Avaliação da segurança da farinha de feijão branco comercial em modelo	4
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUÇÃO.....	6
MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS.....	23
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	28

RESUMO

COELHO, Patrizia Mello. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Avaliação da segurança da farinha de feijão branco comercial em modelo murino.** Orientador: Leandro Licursi de Oliveira. Coorientadora: Silvia Almeida Cardoso e Sergio Luis Pinto da Matta.

A suplementação de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) “in natura” causa perda de peso corporal associado à deficiência na absorção de nutrientes e mudanças histopatológicas. Este efeito tem sido atribuído à fitohemaglutinina (PHA) presente em altas concentrações no feijão vermelho e branco. O objetivo principal deste trabalho visa avaliar a segurança da farinha de feijão branco comercial como suplemento dietético, devido a possíveis malefícios decorrentes, principalmente, da presença de fitohemaglutininas. Animais foram tratados por 14 dias com extrato da farinha de feijão branco (EFFB) nas doses de 2,65g/kg e 5,30g/kg. Após a suplementação com EFFB foi observado significativa redução no peso corporal acompanhado da redução dos valores médios de glicemia, de uma maneira dose dependente, em ambos os grupos em relação ao grupo controle. Também foram observadas mudanças estruturais significativas no epitélio intestinal, como redução na altura das vilosidades intestinais acompanhada pelo aumento da profundidade das criptas e índice mitótico em ambos os tratamentos. Adicionalmente, camundongos tratados com a 5,30g/kg do EFFB apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear na lâmina própria da mucosa intestinal acompanhado do aumento dose dependente da dosagem da quimiocina MCP-1 e óxido nítrico, porém sem causar estresse e danos oxidativos intestinais. Os efeitos deletérios oriundos do uso do EFFB não são perenes, uma vez que os animais tratados, após 14 dias sem os estímulos da FFB apresentaram reparo da integridade da mucosa do jejuno intestinal e restabelecendo os valores de glicemia, minimizando o impacto dos tratamentos sobre a perda de peso corporal, visto que os camundongos voltaram a ganhar peso. Em conclusão, a farinha de feijão comercial não se apresentou segura como suplementação dietética por via oral nas dosagens utilizadas devido aos efeitos antinutricionais e imunomoduladores, possivelmente, causados pela presença de lectina nas doses dos EFFB.

ABSTRACT

COELHO, Patrícia Mello. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Evaluation of the safety of commercial white bean flour in a murine model.** Adviser: Leandro Licursi de Oliveira. Co-adviser: Silvia Almeida Cardoso and Sergio Luis Pinto da Matta.

Common bean supplementation (*Phaseolus vulgaris*) "in natura" causes loss of body weight associated with a deficiency in nutrient absorption and histopathological changes. This effect has been attributed to phytohemagglutinin (PHA) present in high concentrations in red and white beans. The main objective of this work was to evaluate the safety of commercial white bean flour as a dietary supplement, due to possible harms resulting from the presence of phytohemagglutinins. Animals were treated for 14 days with extract of white bean flour (WBFE) at doses of 2.65g/kg and 5.30g/kg. After supplementation with WBFE, a significant reduction in body weight was observed, accompanied by the reduction of mean values of glycemia, in a dose-dependent manner, in both groups in relation to the control group. Significant structural changes were also observed in the intestinal epithelium, such as reduction in intestinal villi height accompanied by increased crypt depth and mitotic index in both treatments. Additionally, mice treated with WBFE 5.30g/kg presented mononuclear inflammatory infiltrate in the lamina propria of the intestinal mucosa accompanied by a dose-dependent increase in the dosage of chemokine MCP-1 and nitric oxide, although without causing intestinal oxidative and oxidative damage. The deleterious effects resulting from the use of the WBFE are not permanent since the treated animals after 14 days without (WBFE) stimuli showed a repair of intestinal jejunal mucosa integrity and the reestablishment of the glycemia values, minimizing the impact of the treatments on the body weight loss, since the mice regained weight. In conclusion, commercial bean flour did not prove to be safe as oral dietary supplementation at the dosages used because of the antinutritional and immunomodulatory effects, possibly caused by the presence of lectin at the doses of WBFE.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão branco (*Phaseolus vulgaris*) pertence à família *Fabaceae*. Ele é amplamente consumido pela população brasileira como alimento e constitui a base alimentar da maioria dos brasileiros (Santos *et al.*, 2009).

A obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. Sua prevalência tem aumentado progressivamente e seu tratamento é imprescindível, pois ela está associada ao aparecimento de diversas doenças crônicas (WHO, 2014). Uma pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde revelou que a obesidade cresceu 60% entre 2006 e 2016 no Brasil (Brasil 2016).

Dados a gravidade da obesidade e os efeitos colaterais da terapia tradicional, a busca por terapias alternativas que possam ser adjuvantes do tratamento é imprescindível. Atualmente diversos produtos comercializados na forma de farinha estão disponíveis como coadjuvantes na dieta para redução de peso, entre eles, a farinha de feijão branco (FFB) obtida a partir da secagem e moagem do feijão branco cru. A FFB contém em sua composição: carboidratos, proteínas e fibras. Um destes ingredientes é a faseolamina, um inibidor da enzima digestiva alfa-amilase, capaz de inibir a absorção de carboidratos, promovendo a perda de peso corporal (Colaço & Degáspari, 2014).

Entretanto, além da faseolamina, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) contém componentes tóxicos que induzem sintomas clínicos após seu consumo (Fig.1).

Serial Number	Components of kidney beans	Clinical symptoms
1.	Lectins	Acute gastroenteritis, increased level of gut bacteria, enhanced permeability of intestine, mucottractive effects, abdominal discomfort, pyrexia, and dehydration in kidney [50–52]
2.	Phytohaemagglutinins	Extreme nausea, vomiting, diarrhea, occasional abdominal pain, severe acute gastroenteritis, impaired growth, intestinal malabsorption, and defective liver functions [53–55]
3.	α -Amylase inhibitor	Impaired carbohydrate digestion and weight loss [56]
4.	Trypsin inhibitor	Pancreatic enlargement and growth depression [57]
5.	Chymotrypsin inhibitor	Indigestion and abdominal pain [58]
6.	Phytate	Mineral deficiency [59]
7.	Saponins	Hypocholesterolemia, hemolysis of red blood cells, antispermatic effects on human spermatozoa [60]
8.	Allergens	Allergic rhinitis, bronchial asthma, atopic dermatitis, and gastrointestinal disorders [7]

Figure 1- Sintomas clínicos induzidos por components do feijão comum (adaptado de Kumar *et al.*, 2013).

Em humanos, o consumo de feijão comum cru ou mal cozido tem sido associado à gastroenterites, má absorção intestinal e comprometimento do crescimento corporal que tem sido atribuídos, em grande parte, à fitohemaglutinina (PHA) presente em alta concentração nas variedades vermelho e branco do feijão comum. A fitohemaglutinina é um tipo especial

de lectina e compreende 5 tipos de isolectinas. Lectinas são proteínas capazes de interagir de forma reversível e seletiva a carboidratos (Kumar *et al.*, 2013).

Em animais de laboratório, a suplementação de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) “in natura” causa perda de peso corporal associado à deficiência na absorção de nutrientes e mudanças histopatológicas intestinais (Cholski, 2007) em decorrência da ligação de altas concentrações de lectina indigesta com receptores glicosilados dos enterócitos localizados nas vilosidades da mucosa intestinal (Kumar *et al.*, 2013).

Em resposta à injúria da mucosa intestinal, o recrutamento coordenado de leucócitos tem um papel de mediar a resposta inflamatória de defesa do hospedeiro através da liberação de mediadores inflamatórios que coordenam a resolução da inflamação e reparo tecidual (Leoni *et al.*, 2015). Na fase aguda da inflamação, monócitos inflamatórios e macrófagos residentes são estimulados por lectinas a secretarem moléculas efetoras como, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS) e quimiocinas MCP-1 (Keshewani e Sodhi, 2007).

Em alguns casos, a exposição contínua ao antígeno agressor gera estresse oxidativo, amplificando a resposta inflamatória, com consequente dano tecidual, podendo se tornar crônica, gerando doenças inflamatórias intestinais (Kumar *et al.*, 2010). O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre antioxidantes e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) que causam danos a membranas celulares por um processo chamado peroxidação lipídica (Agrawal e Sharma, 2010). Para evitar danos oxidativos causados por ROS e RNS, as células possuem um sistema enzimático antioxidante como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (Hermes-Lima, 2004).

A farinha de feijão branco é amplamente comercializada pela internet ou no comércio local, porém, por não se tratar de produto purificado, os efeitos do uso deste produto são desconhecidos, podendo apresentar possíveis malefícios decorrentes, principalmente, da presença de componentes antinutricionais na sua composição. De acordo com a literatura, grande parte dos suplementos para controle de peso não possui estudos que justifiquem seu uso (Silva e Ferreira, 2014).

Com base no presente exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a segurança do extrato da farinha de feijão comercializada como suplemento dietético, através de efeitos antinutricionais e pró-inflamatórios decorrentes, principalmente, da alta concentração de lectina presente nos extratos administrados por via oral.

2. REFERÊNCIAS

Brasil 2016. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília, 2016.

Chokshi,D. (2007). Subchronic oral toxicity of a standardized white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) extract in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, p. 32–40.

Colaço PC, Degáspari CH. (2014). Benefícios da faseolamina (*Phaseolus vulgaris* L.) - uma revisão. *Visão Acad.*,15(1):107-18.

Kumar, S., Verma, A.K., Das, M., Jain, S.K., & Dwivedi, P. (2013). Clinical complications of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) consumption. *Nutrition*, p. 1-7.

Silva, L.F.M., & Ferreira, K.S. (2014). Segurança alimentar de suplementos comercializados no Brasil. *Rev Bras Med Esporte*, vol. 20, N.5.

World Health Organization.Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva, 2014.

1. ARTIGO

Avaliação da segurança da farinha de feijão branco comercial em modelo murino

RESUMO

A suplementação de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) “in natura” causa perda de peso corporal associado à deficiência na absorção de nutrientes e mudanças histopatológicas. Este efeito tem sido atribuído à fitohemaglutinina (PHA) presente em altas concentrações no feijão vermelho e branco. O objetivo principal deste trabalho visa avaliar a segurança da farinha de feijão branco comercial como suplemento dietético, devido a possíveis malefícios decorrentes, principalmente, da presença de fitohemaglutininas. Animais foram tratados por 14 dias com extrato da farinha de feijão branco (EFFB) nas doses de 2,65g/kg e 5,30g/kg. Após a suplementação com EFFB foi observado significativa redução no peso corporal acompanhado da redução dos valores médios de glicemia, de uma maneira dose dependente, em ambos os grupos em relação ao grupo controle. Também foram observadas mudanças estruturais significativas no epitélio intestinal, como redução na altura das vilosidades intestinais acompanhada pelo aumento da profundidade das criptas e índice mitótico em ambos os tratamentos. Adicionalmente, camundongos tratados com a 5,30g/kg do EFFB apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear na lâmina própria da mucosa intestinal acompanhado do aumento dose dependente da dosagem da quimiocina MCP-1 e óxido nítrico, porém sem causar estresse e danos oxidativos intestinais. Os efeitos deletérios oriundos do uso do EFFB não são perenes, uma vez que os animais tratados, após 14 dias sem os estímulos da FFB apresentaram reparo da integridade da mucosa do jejuno intestinal e restabelecendo os valores de glicemia, minimizando o impacto dos tratamentos sobre a perda de peso corporal, visto que os camundongos voltaram a ganhar peso. Em conclusão, a farinha de feijão comercial não se apresentou segura como suplementação dietética por via oral nas dosagens utilizadas devido aos efeitos antinutricionais e imunomoduladores, possivelmente, causados pela presença de lectina nas doses dos EFFB.

Palavras chaves: farinha de feijão branco, perda de peso, lectina, segurança, toxicidade, imunomodulação

ABSTRACT

Common bean supplementation (*Phaseolus vulgaris*) "in natura" causes loss of body weight associated with a deficiency in nutrient absorption and histopathological changes. This effect has been attributed to phytohemagglutinin (PHA) present in high concentrations in red and white beans. The main objective of this work was to evaluate the safety of commercial white bean flour as a dietary supplement, due to possible harms resulting from the presence of phytohemagglutinins. Animals were treated for 14 days with extract of white bean flour (WBFE) at doses of 2.65g/kg and 5.30g/kg. After supplementation with WBFE, a significant reduction in body weight was observed, accompanied by the reduction of mean values of glycemia, in a dose-dependent manner, in both groups in relation to the control group. Significant structural changes were also observed in the intestinal epithelium, such as reduction in intestinal villi height accompanied by increased crypt depth and mitotic index in both treatments. Additionally, mice treated with WBFE 5.30g/kg presented mononuclear inflammatory infiltrate in the lamina propria of the intestinal mucosa accompanied by a dose-dependent increase in the dosage of chemokine MCP-1 and nitric oxide, although without causing intestinal oxidative and oxidative damage. The deleterious effects resulting from the use of the WBFE are not permanent since the treated animals after 14 days without (WBFE) stimuli showed a repair of intestinal jejunal mucosa integrity and the reestablishment of the glycemia values, minimizing the impact of the treatments on the body weight loss, since the mice regained weight. In conclusion, commercial bean flour did not prove to be safe as oral dietary supplementation at the dosages used because of the antinutritional and immunomodulatory effects, possibly caused by the presence of lectin at the doses of WBFE.

Keywords: white bean flour, weight loss, lectin, safety, toxicity, immunomodulation

INTRODUÇÃO

O feijão branco, variedade do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), pertence à família *Fabaceae*. Ele é amplamente consumido pela população brasileira como alimento e constitui a base alimentar da maioria dos brasileiros (Santos *et al.*, 2009). A farinha de feijão branco (FFB) contém faseolamina, um inibidor da enzima digestiva alfa-amilase capaz de inibir a absorção de carboidratos, e utilizada como suplemento dietético natural, para auxiliar na luta contra a obesidade (Udani *et al.*, 2004; Celleno *et al.*, 2007; Hayat e colaboradores, 2014).

Em seres humanos, o consumo de feijão comum cru ou mal cozido tem sido associado a severo, mas passageiro, desconforto gastrointestinal (Nasi *et al.*, 2009). Apesar do feijão conter uma variedade de fatores antinutricionais, esse desconforto é atribuído, em grande parte, à alta concentração de fitohemaglutininas (PHA) encontradas, principalmente, no feijão vermelho e branco cru, variedades do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Esta fitohemaglutinina compreende 5 isolectinas (Kumar *et al.*, 2013).

Estudos tem mostrado que PHA e outras lectinas apresentam efeito tóxico e antinutricional ao ser administrada em ratos, pois, por ser resistente à degradação por proteases, podem se ligar a enterócitos e ser extensivamente endocitada, causando danos aos microvilos com consequente alterações histopatológicas e histomorfométricas na mucosa do intestino delgado (Vasconcelos and Oliveira, 2004; Chokshi, 2007). Alguns autores demonstraram que, após remoção da lectina tóxica, o epitélio intestinal se apresenta normal, sugerindo que o dano no epitélio é reversível na mucosa intestinal de ratos (Weinman *et al.*, 1989; Dignass *et al.*, 1996).

Em resposta à injúria da mucosa intestinal, o recrutamento coordenado de leucócitos tem um papel de mediar a resposta inflamatória de defesa do hospedeiro através da liberação de mediadores inflamatórios que coordenam a resolução da inflamação e reparo tecidual (Leoni *et al.*, 2015). Na fase aguda da inflamação, monócitos inflamatórios e macrófagos residentes são estimulados por lectinas a secretarem moléculas efetoras como, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS) e quimiocinas MCP-1 (Kesharwani e Sodhi, 2007).

Em alguns casos, a exposição contínua ao antígeno agressor gera estresse oxidativo, amplificando a resposta inflamatória, com consequente dano tecidual, podendo se tornar crônica, gerando doenças inflamatórias intestinais (Kumar *et al.*, 2010). O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre antioxidantes e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) que causam danos a membranas celulares por um processo chamado peroxidação lipídica

(Agrawal e Sharma, 2010). Para evitar danos oxidativos causados por ROS e RNS, as células possuem um sistema enzimático antioxidante como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) capazes de remover excesso de ROS, evitando o estresse oxidativo (Hermes-Lima, 2004).

Com base no presente exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a segurança do extrato da farinha de feijão branco comercializada como suplemento dietético, através de efeitos antinutricionais e pró-inflamatórios decorrentes, principalmente, da alta concentração de lectina presente nos extratos administrados por via oral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais experimentais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c de 6 a 8 semanas de idade, machos (25 a 30 gramas) foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa – UFV, foram mantidos no biotério do setor de Imunologia e Virologia do Departamento de Biologia Geral – DBG/UFV. Durante os ensaios foram mantidos em condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa do ar (60 a 70%) em ciclos de luz/escuro (12/12) por dia. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. A experimentação animal foi feita respeitando princípios éticos do Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com protocolo experimental aprovado pelo Comissão de Ética Animal da UFV (60/2014).

Produto Alimentício

Amostra de farinha de feijão branco comercial (FFB) com indicação para uso como suplemento alimentar humano (CaCaLia Comercial Ltda) foi obtida no comércio local da cidade de Ubá, MG, Brasil.

Preparo de extratos proteicos brutos (EB) da farinha de feijão branco comercial (FFB)

As concentrações dos extratos proteicos brutos (EB) da farinha de feijão branco comercial (FFB) foram calculadas a partir da dose recomendada pelo fabricante para humanos (17,5g/dia). Para tanto FFB comercial foi acrescentada em tampão PBS 0,15M NaCl pH 7,4 nas seguintes concentrações: 160mg/mL e 320mg/mL. Após homogeneização, as misturas foram mantidas em temperatura ambiente, permanecendo sob leve agitação por aproximadamente 16 horas. Posteriormente, cada suspensão foi filtrada com auxílio de papel-filtro e então centrifugada (4.000 g por 10 min) até total retirada de partículas sólidas. O sobrenadante de cada concentração, denominado extrato de farinha de feijão branco (EFFB), foi devidamente rotulado e armazenado em geladeira (4 °C) para posteriores análises.

Tratamento dos animais

Para avaliar a eficácia e toxicidade do uso do EFFB em camundongos saudáveis, inicialmente, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais (n = 10 animais/grupo), sendo um grupo controle e dois expostos ao EFFB. Os controles receberam PBS, enquanto que os demais animais receberam EFFB nas seguintes concentrações:

2,65g/Kg (T1) e 5,30g/Kg (T2). Durante os dias de tratamento, as doses da EFFB foram administradas diariamente por via oral, com auxílio de cânula de gavagem, com o volume de 0,5 mL por animal. Os camundongos foram pesados individualmente em balança calibrada, diariamente, por um período de 14 dias. Dessa forma, foi feita a média de peso (g) para cada grupo de animal. Cinco animais por grupo foram eutanasiados com 14 dias de tratamento, para avaliar exposição aguda. Os outros animais receberam apenas ração comercial por mais 14 dias, sendo eutanasiados com 28 dias para avaliar recuperação dos possíveis efeitos deletérios causados pelo EFFB. Para eutanásia os animais foram submetidos a jejum de 12 horas e anestesiados com tiopental sódico. A eutanásia se deu por dessangramento total através de punção cardíaca. O sangue foi centrifugado a 3.000 g por 10 minutos, para obtenção do soro. O intestino delgado foi coletado para análise histológica, dosagem de citocinas, óxido nítrico e estresse oxidativo.

Avaliação Bioquímica

A determinação dos níveis plasmáticos de glicose, colesterol e triglicérides foram realizados pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase (Gold Analisa®). Os resultados foram expressos em mg dL⁻¹.

Processamento histológico

No processamento histológico, o intestino delgado, imerso em solução Karnovsky por 24 horas, foi transferido para o etanol 70%. Posteriormente, fragmentos da porção proximal do jejuno foram desidratados em solução crescente de etanol e incluídos em metacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Secções semisseriadas de 2µm foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Germany), respeitando-se o intervalo de no mínimo 40 µm entre os cortes. As secções obtidas foram então coradas com hematoxilina-eosina (HE) e montadas em lâminas de vidro. Para as análises morfológicas e histopatológicas foram usadas imagens capturadas em fotomicroscópio (Olympus BX -53, Tóquio, Japão) equipado com câmera digital pelo microcópio de luz CX31 com câmera acoplada U-CMAD3 (Olympus, Tóquio, Japão). Todas as imagens foram analisadas utilizando o programa Image J®.

Histomorfometria intestinal

Dez vilosidades e vinte criptas foram medidas de 10 imagens capturadas das lâminas histológicas, com ampliação de 100×. A altura de cada vilosidade foi representada pela distância entre o ápice das vilosidades até a região basal, que corresponde à porção de abertura das criptas no lúmen intestinal. A profundidade de cada cripta foi determinada da base da cripta até a região de abertura da mesma que representa a transição entre a cripta e a vilosidade. A atividade mitótica foi expressa como o número de mitoses por 20 criptas celulares. O resultado representou a média obtida das medidas de cada lâmina histológica.

Histopatologia intestinal

Foi realizada uma análise de caráter qualitativo, ao microscópio óptico, a fim de averiguar a presença ou ausência de alterações dos tecidos citados dos animais tratados agudamente com os extratos brutos (EB) da farinha de feijão branco (FFB) em comparação aos tecidos dos animais do grupo controle.

Dosagem de citocinas

Fragmentos de aproximadamente 1g do intestino delgado foram homogeneizados na presença de um inibidor de protease (cocktails inibidor de protease; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em um homogeneizador de tecido portátil (YO-04727-09; LabGEN) e centrifugado a 3000 g por 10 min. O sobrenadante foi recolhido para a análise das citocinas, que foi realizada utilizando BD Cytometric Bead Array (CBA)/ Mouse Inflammation Kit. As citocinas mensuradas foram: Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interferon- γ (IFN- γ), Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10) e Proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). A curva padrão foram determinadas para cada uma das citocinas a partir de um alcance de 20 a 5.000 pg/mL, e analisados no software FCAP 3.0.

Dosagem do óxido nítrico

Os níveis de NO foram indiretamente estimados, baseados na determinação de metabólitos de NO, nitrato e nitrito pela reação de Griess. O homogenato de intestino foi centrifugado a 3000 g, por 10 min e o sobrenadante das amostras recolhido. Em uma placa de 96 poços, foram depositados 50 μ L das amostras. Uma curva padrão foi preparada pela adição de 50 μ L de nitrito de sódio 250 μ M e 50 μ L de PBS, realizando-se diluições sucessivas 1:2,

além do poço do branco contendo somente 50 µL de PBS. Em seguida, em todos os poços foram adicionados 50 µL de mistura 1:1 de soluções de sulfanilamida (1% em H₃PO₄ 2,5%) e dicloreto N-naftiletileno-diamina (0,1% em H₃PO₄ 2,5%). Após 10 minutos de incubação na ausência de luz e em temperatura ambiente, foram feitas as leituras de todos os poços (curva padrão e amostras). A densidade óptica (DO) foi determinada usando um filtro de 570 nm do leitor de placa da Thermo Scientific-Multiskan™ GO. Os resultados foram expressos como µM. Todas as amostras foram medidas em duplicata.

Determinação da catalase (CAT)

A atividade enzimática da Catalase presente nos homogenatos do intestino dos camundongos tratados com EFFB foi avaliada medindo a taxa de decomposição de H₂O₂ ao longo do tempo, de acordo com Aebi (1984). Para isso, 6 µL de amostra juntamente com 600 µL de tampão Fosfato (0,1 M e pH 7,0) foram utilizados como branco para cada amostra enquanto que, para leitura, o tampão Fosfato foi acrescido de H₂O₂ (30%). Dessa forma, as amostras foram submetidas à leitura a 240 nm em espectrofotômetro, durante 60 segundos, para acompanhamento da cinética enzimática. A atividade enzimática foi expressa em Unidades de Catalase por mg de proteína. Todas as amostras foram medidas em duplicata.

Determinação da Superóxido Dismutase (SOD)

A determinação da atividade catalítica da SOD foi determinada pelo método do pirogalol baseado na capacidade da enzima de catalisar a reação do superóxido (O⁻²) em peróxido de hidrogênio, de acordo com Sarban *et al.* (2005). Para isso, 30 µL de amostra foram pipetados juntamente com 99 µL de tampão fosfato (0,1M pH 7,0), 6 µL de MTT (1,25 mM) e 15 µL de pirogalol (100 µM) em placa de 96 poços e incubados durante 5 minutos a 37 °C. O padrão e o branco foram feitos da mesma maneira, porém para ambos não havia amostra e foram utilizados 129 µL e 144 µL de tampão, respectivamente, enquanto que no branco não foi adicionado pirogalol. Por fim, após o tempo de incubação a reação foi parada com 150 µL de DMSO (1,25 mM) e as amostras foram submetidas à leitura a 570 nm em leitor de placas (Thermo Scientific-Multiskan™ GO). A atividade enzimática foi expressa em Unidades de SOD por mg de proteína. Todas as amostras foram medidas em duplicata.

Determinação de Malondialdeído (MDA)

Os sobrenadantes dos homogenatos dos intestinos coletados foram submetidos à reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com a metodologia de Buege e Aust (1978). Dessa forma, 200 µL de cada amostra foram adicionados a 400 µL de solução de TBARS (15% de TCA, 0,375% de TBA e 0,25M de HCl), agitados no vórtex durante 10 segundos e colocados em banho-maria, a 90 °C, durante 40 minutos. Em seguida, após resfriamento, foi efetuada a extração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico com a adição de 600 µL de n-butanol, seguida da centrifugação a 3500 g, durante 5 minutos. Por fim, após centrifugação, 200 µL dos sobrenadantes foram cuidadosamente retirados e submetidos à leitura a 535 nm em leitor de placas (Thermo Scientific-Multiskan™ GO). Os valores de TBARS foram expressos em nmols de malondialdeído (MDA) por mg de proteína. Todas as amostras foram medidas em duplicata.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Foram submetidos à análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido do pós-teste (Tukey) para múltiplas comparações. A significância estatística foi considerada com $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$). As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do EFFB no peso corporal, glicemia e parâmetros bioquímicos séricos

Não foram observados casos de morte ou sintomas de gastroenterite em nenhum dos grupos experimentais durante os 14 dias de tratamento. Os resultados mostraram que a administração oral do EFFB induziu perda progressiva de peso corporal (Fig. 1A) e redução dose-dependente nos níveis séricos de glicose (Fig. 1B) nos grupos T1 e T2, comparados ao controle ($P < 0,05$). Por outro lado, não houve diferença nos níveis de triglicerídeos (Fig. 1C) e colesterol (Fig. 1D) entre os grupos controle, T1 e T2.

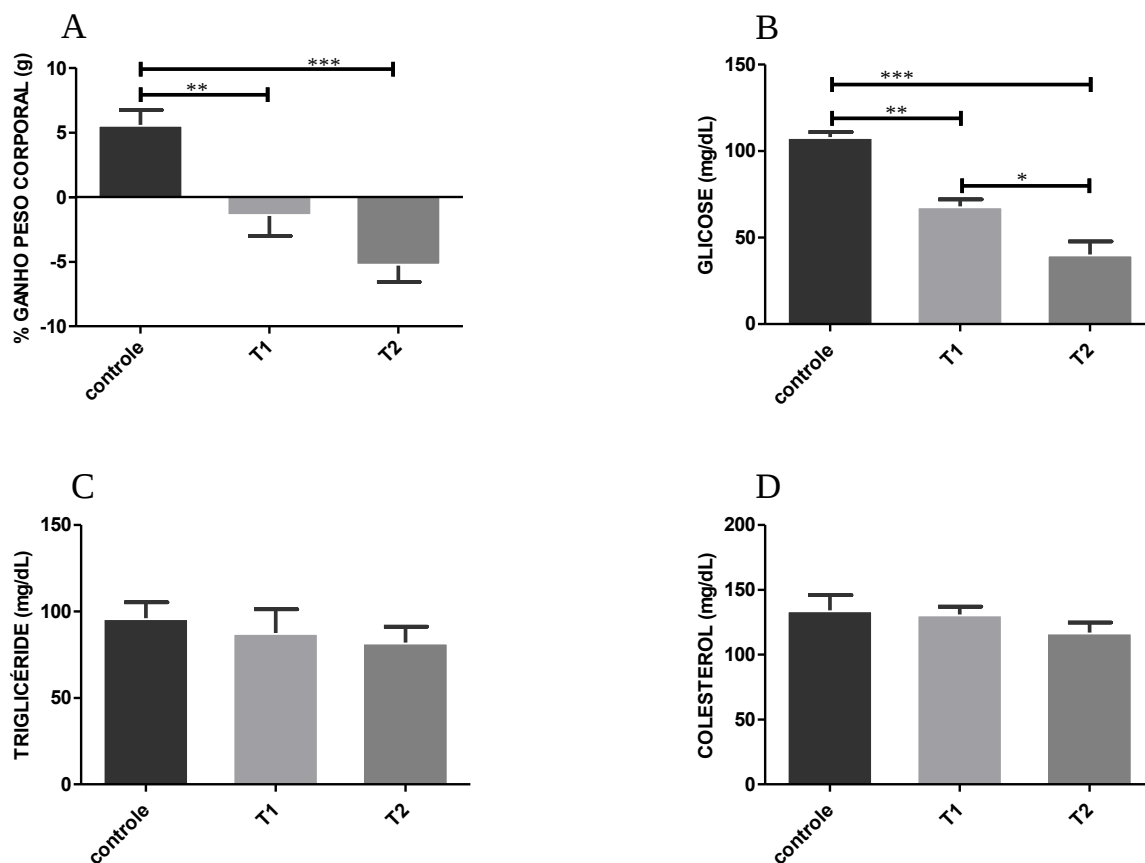


Fig.1 Efeitos sistêmicos das doses do EFFB (T1 e T2). Porcentagem do ganho de peso corporal médio em gramas (1A), Nível sérico de glicose (1B), Nível sérico de triglicérides (1C) e Nível sérico de colesterol total (1D). As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão dos dados, totalizando 5 camundongos por grupo. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos com $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$). ANOVA one-way com teste *post-hoc* de Tukey.

A suplementação oral do EFFB induziu perda ponderal de peso corporal nos grupos T1 e T2 em relação ao controle, sugerindo que o EFFB reduziu a viabilidade calórica, necessária para o ganho de peso corporal, principalmente de animais em fase de crescimento. Este efeito redutor do peso corporal veio acompanhado pela redução dose dependente da glicemia ao final do tratamento, mostrando que EFFB interferiu na absorção de glicose, contribuindo para a perda de peso corporal dos animais tratados. Estes resultados corroboraram com estudos em que a suplementação oral do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cru, bem como, de sua fitohemaglutinina (PHA) purificada, reduziu a atividade absorviva da mucosa intestinal, resultando na perda progressiva de peso e inibição do crescimento (Kik et al. 1990; Zucoloto et al.1991; Ramadass et al. 2010; Gislason. 2011). Estudos tem demonstrado que a administração da farinha do feijão “Terapy” (*Phaseolus acutifolius*), bem como, do inibidor de tripsina purificado, causou perda de peso corporal, semelhante ao presente estudo, devido à hipertrofia/hiperplasia pancreática. Entretanto, este fator antinutricional não foi o principal responsável pela toxicidade (Osman et al. 2003). Este dado foi confirmado por outro estudo em que a perda de peso observada nos ratos alimentados com o extrato da farinha do feijão “Terapy” (*Phaseolus acutifolius*) foi devido à presença da lectina no extrato, uma vez que o extrato era ausente de inibidor de tripsina (Martínez et al. 2015).

Por outro lado, diferente do presente estudo, a administração oral de diferentes extratos comerciais à base do feijão branco induziu efeito redutor na hiperglicemia em ratos saudáveis e diabéticos, contribuindo com a redução do ganho de peso corporal devido à presença de faseolamina que atua inibindo a atividade da amilase pancreática no lúmen intestinal, sem contudo, causar má nutrição (Cholski et al. 2007; Fantini et al.2009; Gouveia et al.2014).

Os tratamentos avaliados não interferiram no metabolismo dos lipídios. Estudo mostrou resultados similares, aonde os autores observaram que o consumo de uma preparação caseira de farinha de feijão branco em concentrações crescentes (0,5; 0,75; 1g/kg) não alterou significativamente a concentração de triglicérides e colesterol total de camundongos adultos em relação ao controle (Molz e Cordeiro. 2014).

Efeito do EFFB na morfometria e histopatologia da mucosa do jejuno intestinal

No epitélio intestinal foi observado mudanças morfométricas significativas nos grupos T1 e T2. A altura das vilosidades reduziu (Fig. 2A), enquanto que a profundidade das criptas (Fig. 2B) foi aumentada, em comparação ao controle ($P<0,05$). O índice mitótico nas criptas

foi significativamente aumentado (Fig. 2C) em relação ao controle, de uma maneira dose dependente ($P<0,05$).

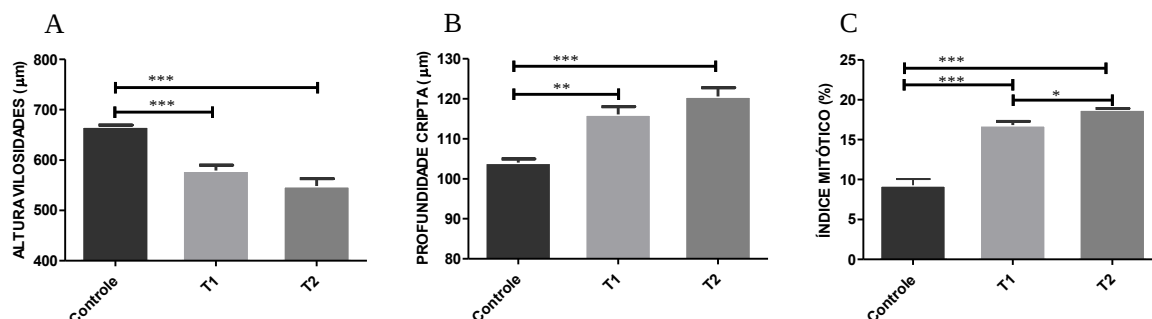


Fig. 2 A-C Avaliação morfométrica do epitélio da mucosa intestinal de camundongos submetidos à suplementação oral com as doses do EFFB (T1 e T2). Altura das vilosidades (2A), Profundidade de criptas (2B) e Índice mitótico (2C). As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão dos dados, totalizando 5 camundongos por grupo. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos com $p<0.05$ (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.005$). ANOVA one-way com teste *post-hoc* de Tukey.

Na lâmina própria da mucosa intestinal dos camundongos do grupo T2 foi observado infiltrado inflamatório constituído de células mononucleares (Fig. 3). Tanto o grupo controle quanto o grupo T1 não apresentaram focos inflamatórios aparente na lâmina própria.

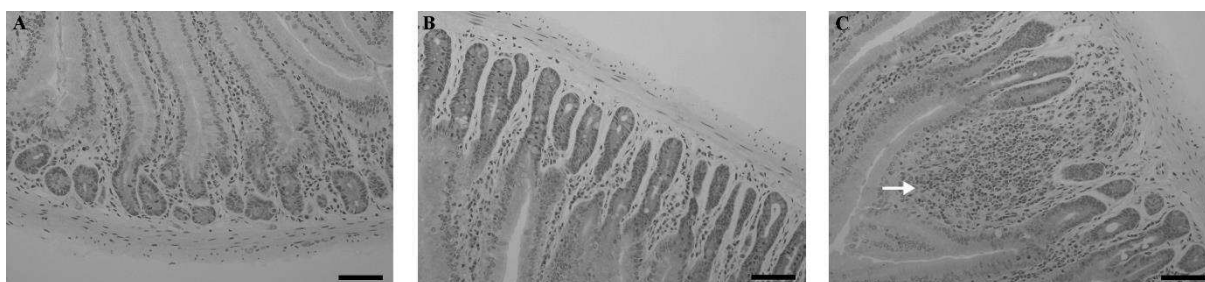


Fig. 3 A-C Análise histopatológica da mucosa do jejuno proximal com lâmina própria normal no controle (3A) e grupo T1 (3B). Presença de infiltrado inflamatório (seta) na lâmina própria da mucosa do jejuno de camundongos do grupo T2 (3C). Secções coradas em hematoxilina eosina (HE). Escala das barras: 40µm

A suplementação oral do EFFB reduziu a altura das vilosidades do jejuno intestinal nos grupos T1 e T2, indicando que o EFFB causou toxicidade às células absortivas do epitélio com consequente redução da área de absorção intestinal, levando à má absorção de glicose observada nos animais destes grupos. Este resultado foi consistente com estudos que mostraram o efeito tóxico da suplementação de aglutininas isolada do trigo (WGA) e do feijão vermelho e branco (PHA) sobre a morfologia e função absortiva da mucosa intestinal em ratos (Lorenzsonn and Olsen. 1982; Lorenz-Meyer et al. 1985; Zucoloto et al. 1991). Segundo estes estudos e outros da literatura, a interação de altas concentrações de lectinas de leguminosas com sítios glicosilados da membrana de enterócitos levou a danos na base das vilosidades e aumento da permeabilidade da barreira epitelial, reduzindo a absorção de nutrientes, e consequente perda de peso (Ramadass et al. 2010; Ferreti et al. 2012; Kumar et al. 2013; Neiri et al. 2015).

Após comprometimento da integridade da mucosa intestinal, os grupos T1 e T2 apresentaram aumento da profundidade de criptas em virtude da hiperplasia, resultado do alto índice mitótico observado no estudo, indicando uma resposta adaptativa à toxicidade causada pelo EFFB, na tentativa de restaurar a integridade da camada epitelial e consequentemente a absorção de nutrientes. Resultado semelhante foi observado após suplementação da farinha de feijão branco (*Phaseolus vulgaris* L. var. Beldia) (Neiri et al. 2015). Entretanto, a mucosa intestinal não foi capaz de se auto-regenerar. Provavelmente devido ao período prolongado de exposição do EFFB.

Simultaneamente ao efeito tóxico sobre o epitélio intestinal, foi observado infiltrado inflamatório mononuclear na lâmina própria da mucosa intestinal do grupo T2, indicando que o EFFB induziu inflamação. Resultado semelhante foi observado em estudos *in vitro* e *in vivo* que mostraram que lectinas do trigo (Punder and Pruimboom. 2013), bem como, da soja (Benjamim et al.1997) e feijão comum (Sjolander et al. 1984, 1986; Pusztai. 1993; Sarv and Hõrak. 2009) induziram aumento da permeabilidade intestinal que permitiu a passagem de lectinas dietéticas para a corrente sanguínea e consequente ativação de fagócitos. Com base nestes estudos, o efeito pró-inflamatório do EFFB parece estar envolvido com a habilidade da lectina PHA em aumentar a permeabilidade celular e facilitar sua transcitose para a corrente sanguínea. Esta resposta inflamatória teve o intuito de reparar a integridade da membrana dos enterócitos e eliminar antígenos do EFFB, inclusive lectina (Leoni et al. 2015).

Efeito do EFFB no perfil inflamatório da mucosa do jejuno intestinal

A concentração de MCP-1 aumentou nos grupos T1 e T2 em relação ao controle, sendo este aumento dependente da dose ($P < 0,05$) (Fig. 4A). A concentração de óxido nítrico (NO) aumentou, de forma significativa, no grupo T2 quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$), sendo este aumento dose dependente ($p < 0,01$) (Fig. 4B). Não houve mudança significativa de Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interferon- γ (IFN- γ), Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10) após desafio com EFFB em qualquer das doses examinadas (dados não apresentados).

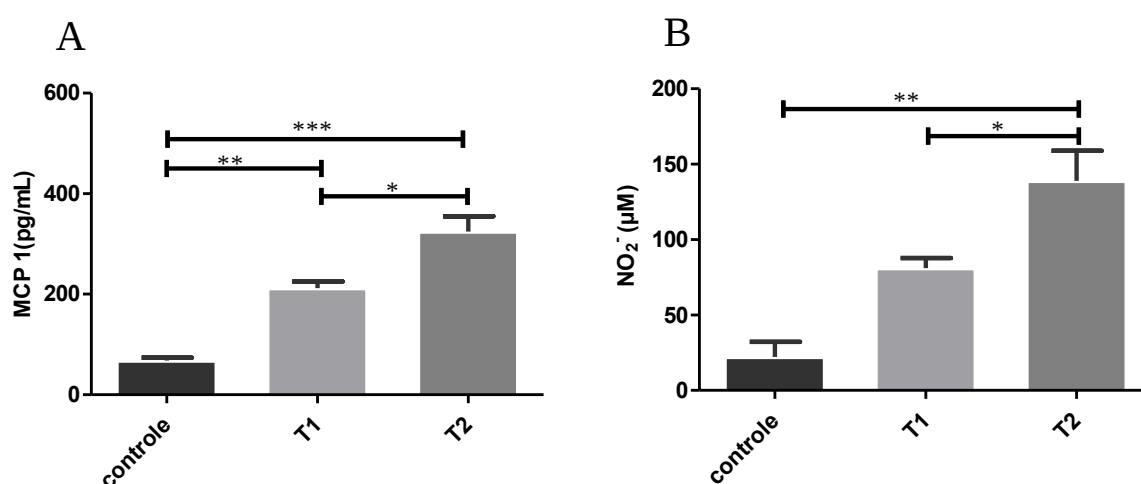


Fig. 4 A- B Nível de quimiocina MCP1 (4A) e dosagem de óxido nítrico (4B) em homogenato de intestino. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão dos dados ($n=5$). Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos com $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$). ANOVA one-way com teste *post-hoc* de Tukey.

MCP-1, um membro da família de quimiocinas C-C, está implicada na mediação da inflamação aguda e crônica em vários tecidos, inclusive intestino. A suplementação do EFFB induziu aumento dose dependente de MCP-1 em homogenato intestinal, indicando o potencial imunoestimulador do EFFB. Efeito semelhante foi observado após exposição do trigo e do feijão “castor”, em que antígenos resistentes à proteólise estimularam monócitos e macrófagos do sistema imune com consequente aumento na produção de MCP-1 em intestino de ratos (Yoder *et al.*, 2007; Junker *et al.*, 2012). Estudos *in vitro* também mostraram secreção de MCP-1 em leucócitos mononucleares estimulados pela lectina PHA do feijão comum (Yoshimura *et al.* 1989; 1990). Baseado nestes achados, células inflamatórias do intestino dos grupos T1 e T2 foram responsáveis pela iniciação da inflamação intestinal pela secreção de MCP-1.

MCP-1, também chamada CCL2, tem um papel importante no recrutamento de monócitos inflamatórios circulantes e macrófagos adicionais para os locais inflamados (Takada *et al.*, 2010). Estudos mostraram que MCP-1 desempenhou um papel fundamental na patogênese de uma variedade de doenças intestinais que são caracterizadas por infiltração de células mononucleares (Reinecker *et al.*, 1995; Grimm *et al.*, 1996). Após exposição ao EFFB, o aumento dose dependente de MCP-1 coincidiu com o infiltrado inflamatório no grupo T2 indicando que o influxo de monócitos inflamatórios para a área inflamada correlacionou-se com os níveis de MCP-1.

Simultaneamente à produção de MCP-1, foi observado aumento significativo da dosagem de óxido nítrico (NO) no grupo T2, coincidindo com áreas de infiltrado inflamatório, indicando que o EFFB estimulou células inflamatórias a sintetizar óxido nítrico de maneira dose dependente. Estudos *in vitro* mostraram macrófagos ativados pela lectina PHA do feijão comum. (Kesherwani e Sodhi, 2007).

Algumas respostas imunes podem ser mediadas pela produção e liberação de óxido nítrico por células inflamatórias ativadas. NO apresenta função imunoregulatória sobre a produção de várias quimiocinas, inclusive MCP-1 e a resposta quimiotática a leucócitos (Bogdan C., 2001). O aumento de NO induzido pelo EFFB coincidiu com o aumento de MCP-1, sugerindo assim o papel imunoregulador do óxido nítrico durante influxo de células mononucleares para o infiltrado inflamatório observado no grupo T2. Figueiredo e colaboradores (2009) sugeriram o envolvimento de NO na migração de leucócitos induzida pela lectina isolada das sementes de *Dioclea rostrata* (DrosL).

Avaliação do estresse oxidativo na mucosa do jejuno intestinal após administração do EFFB

A atividade de SOD não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) nos grupos T1 e T2, em relação ao grupo controle (Fig. 5A). Já atividade de CAT reduziu significativamente no grupo T2 ($p < 0,05$) com relação ao controle e o grupo T1 ($p < 0,01$) (Fig. 5B). A concentração de MDA não apresenta diferença significativa ($p > 0,05$) nos grupos tratados com o EFFB em relação ao controle, (Fig. 5C).

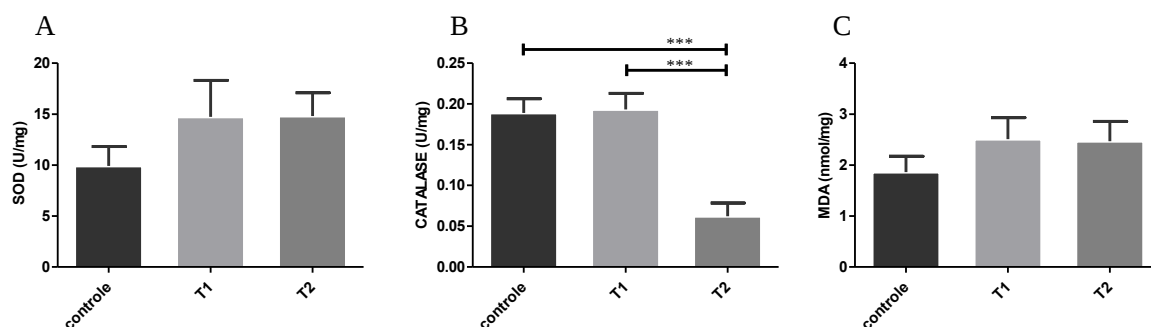


Fig. 5 A-C Atividade das enzimas antioxidantes SOD (5A), CAT (5B) e Níveis de MDA (5C) em homogenato de intestino. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão dos dados, totalizando 5 camundongos por grupo. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos com $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$). ANOVA one-way com teste *post-hoc* de Tukey.

A atividade de SOD e CAT são importantes mecanismos de defesa contra efeitos tóxicos de ROS, dentre eles, radicais superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). SOD catalisa a conversão de radicais superóxido em peróxido de hidrogênio, que é então degradada pela CAT em água e oxigênio (Droge, 2002).

Neste estudo, a atividade da enzima SOD teve um aumento expressivo na mucosa intestinal dos grupos tratados, sugerindo que a fagocitose de peptídeos do EFFB pelas células inflamatórias induziu grande produção de radical superóxido, iniciando a geração de ROS. A atividade de CAT apresentou significativa diminuição no grupo T2, levando à excessiva utilização desta enzima em função da alta produção de peróxido de hidrogênio. Estes resultados corroboraram com estudos que mostraram que a redução da atividade das enzimas antioxidantes, como a catalase, foi devido à sua excessiva utilização na remoção dos radicais livres (Ighodaro and Akinloye, 2017).

O marcador malondialdeído (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica, indica danos teciduais após estresse oxidativo. Nos grupos tratados com o EFFB não foi observado aumento significativo no nível de MDA no intestino, indicando que as mudanças na atividade de SOD e CAT protegeram as células, eliminando o excesso de ROS, evitando o estresse oxidativo no final do tratamento com o EFFB. Este resultado foi concomitante com o aumento de óxido nítrico, confirmando seu efeito antioxidante, impedindo danos no intestino. Em concentrações aumentadas, efeitos antioxidantes de NO ocorrem através da sua ação direta ao decompor radicais lipídicos primários da peroxidação lipídica, atenuando danos teciduais (D'ischia et al. 2000). Dessa forma, a fagocitose em células inflamatórias da mucosa intestinal

não gerou dano oxidativo, evidenciando que o EFFB desencadeou uma resposta imune controlada.

Avaliação de reversão de dano intestinal após tratamento com EFFB

Após remoção da suplementação do EFFB da dieta dos grupos tratados, ao fim de 28 dias de experimentação não houve diferença significativa ($P>0,05$) para as variáveis porcentagem da média de ganho de peso corporal (Fig. 6A), níveis séricos de glicose (Fig. 6B) e histomorfometria das vilosidades (Fig. 6C) e criptas (Fig. 6D) do epitélio intestinal entre os grupos controle, T1 e T2.

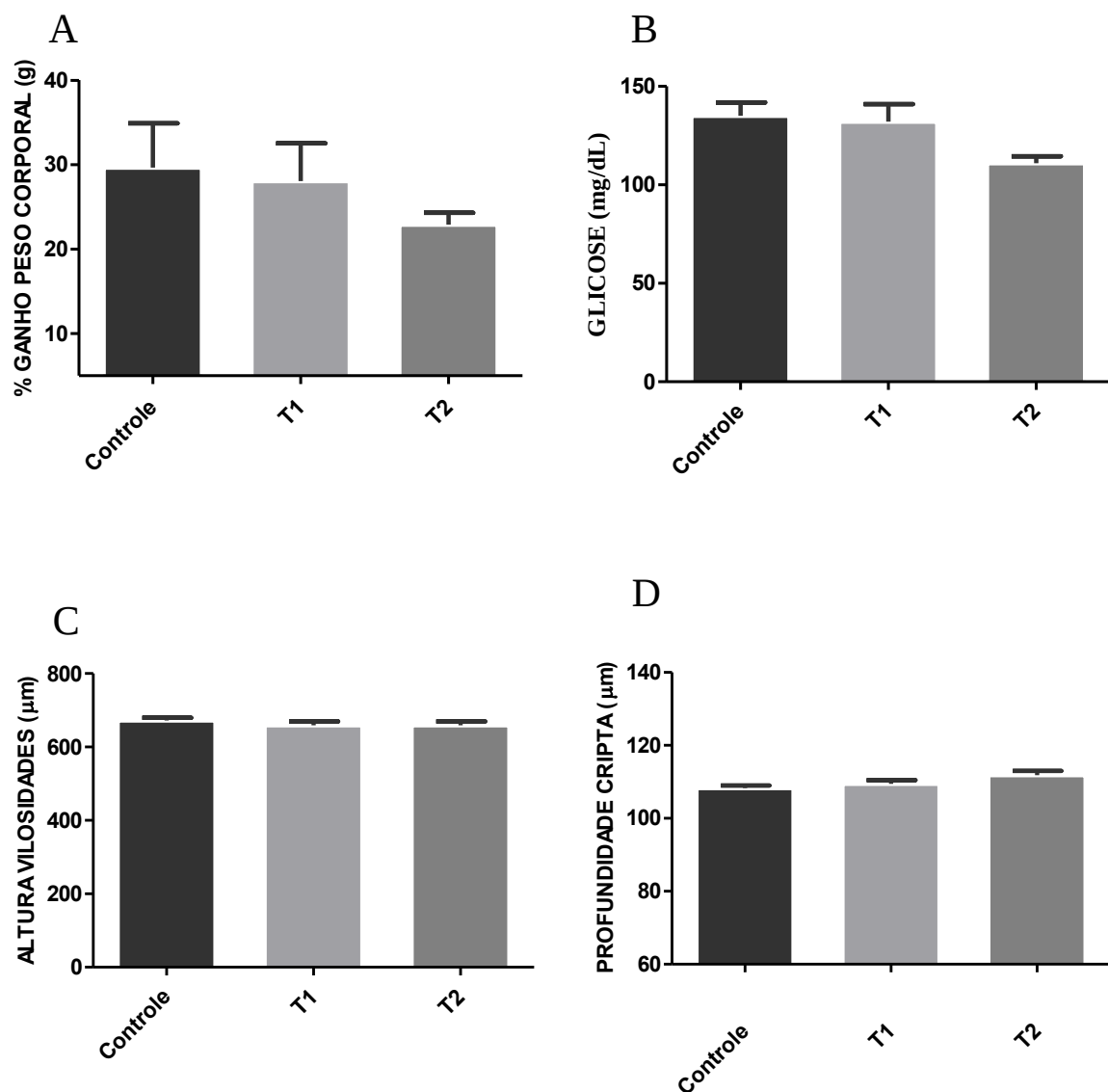


Fig. 6 A-D Avaliação de reversão de dano 14 dias após suplementação oral com as doses do EFFB (T1 e T2). Porcentagem de ganho de peso (6A), Nível sérico de glicose (6B), Altura das vilosidades (6C) e Profundidade de criptas (6D). As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão dos dados, totalizando 5 camundongos por grupo. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos com $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$). ANOVA one-way com teste *post-hoc* de Tukey.

Estes dados indicaram que 14 dias após a remoção da FFB, houve reparo da histologia do epitélio intestinal, com consequente restabelecimento da glicemia e ganho de peso nos camundongos tratados. Este dado corroborou com estudos em que o dano no epitélio foi reversível após exposição a altas doses de PHA (Weinman *et al.*, 1989; Dignass *et al.*, 1996).

CONCLUSÃO

A farinha de feijão branco comercial avaliada no presente estudo apresentou efeitos tóxicos, dependente da dose do extrato suplementado por via oral, caracterizados por alterações nos níveis séricos de glicose e na histomorfometria do epitélio da mucosa no jejuno proximal do intestino delgado, contribuindo com a redução no peso corporal dos camundongos tratados com as doses da FFB durante 14 dias de tratamento. Após remoção da suplementação com o EFFB, as alterações observadas foram revertidas, com consequente restabelecimento do peso corporal nos camundongos tratados.

Adicionalmente, a maior dose do EFFB estimulou uma resposta inflamatória aguda, caracterizada por alteração histopatológica na lâmina própria da mucosa intestinal e aumento da dosagem de mediadores inflamatórios, sem contudo, causar estresse oxidativo, com o intuito de eliminar antígenos presentes no EFFB, principalmente lectinas.

Com base nos achados do presente estudo, a farinha de feijão branco comercial não se apresentou segura como suplemento dietético nas doses avaliadas.

REFERÊNCIAS

- Agrawal, A., & Sharma, B. (2010). Pesticides induced oxidative stress in mammalian systems. *Int. J. Biol. Med. Res.*, 3, 90–104.
- Brasil 2016. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília, 2016.
- Benjamin, C.F., Figueiredo, R.C., Henriques, M.G.M.O., & Barja-Fidalgo, C. (1997). Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, p. 48–54.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.*, 2(10):907-16.
- Celleno, L., Tolaini, M.V., Amore, A., Perricone, N.V. & Preuss, H.G. (2007). A Dietary Supplement Containing Standardized *Phaseolus vulgaris* Extract Influences Body Composition of Overweight Men and Women. *Int. J. Med. Sci.*, v.4, n.1, p. 45-52.
- Chokshi,D. (2007). Subchronic oral toxicity of a standardized white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) extract in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, p. 32–40.
- D'ischia, Marco, Palumbo, Anna Buzzo, & Ferdinando. (2000). Interactions of Nitric Oxide with Lipid Peroxidation Products under Aerobic Conditions: Inhibitory Effects on the Formation of Malondialdehyde and Related Thiobarbituric Acid-Reactive Substances. *Nitric Oxide*, v. 4, n. 1, p. 4–14.
- Dignass, A. U., Stow, J. L., & Babyatsky, M. W. (1996). Acute epithelial injury in the rat small intestine in vivo is associated with expanded expression of transforming growth factor α and β . *Gut*, v. 38, p. 687-693.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- Fantini, N., Cabras, C., Lobina, C., Colombo, G., Gessa,G.L., Riva, A., Donezelli F., Morazzoni,P., Bombardelli,E., & Carai M. (2009). Reducing Effect of a *Phaseolus vulgaris* Dry Extract on Food Intake, Body Weight, and Glycemia in Rats. *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, p. 9316–9323.

Ferretti, G., Bacchetti, T., Masciangelo, & S., Saturni, L. (2012). Celiac Disease, Inflammation and Oxidative Damage: A Nutrigenetic Approach. *Nutrients*, 4, 243-257.

Figueiredo, J.G., Bitencourt, F.S., Mota, M.R., Silvestre, P.P., Aguiar, C.N., Benevides, R.G., Nascimento, K.S., de Moura, T.R., dal-Secco, D., Assreuy, A.M., Cunha, F.Q., Vale, M.R., Cavada, B.S., & Alencar, N.M. (2009). Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D. rostrata* lectin: involvement of cytokines and nitric oxide. *Toxicon*, Fortaleza, v. 54, n. 6, p. 736-744.

Gislason SJ. (2011). Food Choice. *Environmed Research Inc.*, p.121, 2011, Sechelt, British Columbia. Canada.

Grimm, M. C., S. K. Elsbury, P. Pavli, & W. F. Doe. (1996). Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa. *J. Leukoc. Biol.* 59: 804–812.

Gouveia, N.M., Alves, F.V., Furtado, F.B., Scherer, D.L., Mundim, A.V., & Espindola, F.S. (2014). An *in vitro* and *in vivo* study of the α -amylase activity of Phaseolamin. *Journal of Medicinal Food*, v. 17, n.8, p. 915-920.

Hayat I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A., & Bashir, S. (2014) Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.54, n.5, p. 580-92.

Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Storey, Kenneth B. (Ed.), John Wiley & Sons, Inc, Wiley-Liss, NY, pp. 319–368.

Ighodaro, O.M. & Akinloye, O.A. Alex (2017). *J Med*,

Junker, Y., Zeissig, S., Kim, S., Barisiani, D., Weiser, H., Leffer, D.A., Zevallos, V., Libermann, T.A., Dillon, S., Freitag, T.L., Kelly, C.P. & Schuppan, D. (2012). Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J. Esp. Med*, v.209, n. 13, pp. 2395-2408.

Kik, MJL., Huisman, J., Van Der Poel, A.F.B., & Mouwen, J.M.V.M. (1990). Pathologic Changes of the small intestinal mucosa of Pigs after feeding *Phaseolus vulgaris* beans. *Vet Pathol*, v. 27, p. 329-334.

Kesharwain, V., & Sodhi, A. (2007). Differential activation of macrophages in vitro by lectin Concanavalin A, phytohemagglutinin and wheat germ agglutinin: production and regulation of nitric oxid. *Nitric Oxid*, v. 16, p. 295-305.

Kumar, V., Abbas, A. K., & Fausto, N. ROBBINS E COTRAN. (2010). Patologia – bases patológicas das doenças. Elsevier, 8ª ed., p. 43-78, 1480 p, Rio de Janeiro.

Kumar, S., Verma, A.K., Das, M., Jain, S.K., & Dwivedi, P. (2013). Clinical complications of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) consumption. *Nutrition*, p. 1-7.

Leoni, G., Neumann, PA., Sumagin, R., Denning, TL., & Nusrat, A. (2015). Wound repair: role of immune–epithelial interactions. *Mucosal Immunol.*, v. 8(5), p. 959–968.

Lorenzsonn, V., & Olsen, W. A. (1982). In vivo responses of rat intestinal epithelium to intraluminal dietary lectins. *Gastroenterology*, v. 82, p. 838-48.

Lorenz-Meyer, H., Roth, H., Elsasser, P., & Hahn, U. (1985). Citotoxicity of lectins on rat intestinal mucosa enhanced by neuraminidase. *European Journal of Clinical Investigation*, v.15, p. 227-234.

Martínez, R.F., García, K.G., Arteaga, I.T., Mendez, A.J.R., Carrillo, M.J.G., Celis, U.M., Zaragoza, M.V.A., Labra, A.B., Corona, M.A.G., Álvarez, J.P.R., Olaya, E.M., Montemayor, H.M.A., Garcia, O.P., & Gasca, T.G. (2015). Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. *Toxicology Reports*, v.2, p. 63-69.

M. Osman, P. Reid, & C. Weber. (2003). The effect of feeding Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) proteinase inhibitors on the growth on pancreas of young mice, *J. Nutr.*, 2 111–115.

Molz, S., & Cordeiro, DN. (2014). (2014). Efeito hipolipemiante da farinha de feijão branco (*phaseolus vulgaris*) em camundongos hiperlipidêmicos. *Saúde Meio Ambient.*, v. 3, n. 2, p. 44-52.

Nasi, A., Picariello, G., & Ferranti, P. (2009). Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. *Journal of Proteomics*, vol. 72, pp. 527–538.

Neiri,N., Cho N., Bergaoui N., Mhamdi, F., Ammar, A.B., Trabelsi, N., Zekri, S., Guémira, F., Mansour, A.B., Sassi, F.H., Aissa-Fennira, F.B., Noah, H. D., Bender, A. E., Reaidi, G. B., & Gilbert, R. J. (2015). Effect of White Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris* L. var. Beldia) on Small Intestine Morphology and Function in Wistar Rats. *Journal of Medicinal Food*, v. 18, n. 12, p. 1-13.

Punder K., & Pruimboom, L. (2013). The Dietary Intake of Wheat and other Cereal Grains and Their Role in Inflammation. *Nutrients*, 5, 771-787.

Pusztai, A. (1993). Dietary lectins are metabolic signals for the gut and modulate immune and hormone functions. *European Journal of Clinical Nutrition* 47, 691–699.

Ramadass, B., Dokladny, K., Moseley, P.L., Patel, Y.R., & Lin, H.C. (2010). Sucrose Co-administration Reduces the Toxic Effect of Lectin on Gut Permeability and Intestinal Bacterial Colonization. *Dig Dis Sci*, 55:2778–2784.

Reinecker, H. C., E. Y. Loh, D. J. Ringler, A. Mehta, J. L. Rombeau, & R. P. MacDermott. (1995). Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology*, 108: 40–50.

Santos, A. P. S., Gomes, P.T.T., Antunes, L.B.B., Ramilo, V.M.P., Almeida, J.M., Rigo, M., & Santa, O.R.D. (2009). Farinha de feijão (*Phaseolus vulgaris*): caracterização química e aplicação em torta de legumes. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v.11, n.2, p. 227- 236.

Sarv, T., & Hõrak, P. (2009). Phytohaemagglutinin injection has a long-lasting effect on imune cells. *J. Avian Biol*, 40: 569_571.

Sjolander A, Magnusson KE, & Latkovic S. (1984). The effect of concanavalin A and wheat germ agglutinin on the ultrastructure and permeability of rat intestine. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 75, 230–236.

Sjolander A, Magnusson KE & Latkovic S. (1986). Morphological changes of rat small intestine after short-time exposure to concanavalin A or wheat germ agglutinin. *Cell Structure and Function*, 11, 285–293.

Takada Y., Hisamatsu,T., Kamada,N., Kitazume M.T.,, Honda,H., Oshima,Y., Saito,R., Takayama,T., Kobayashi,T., Chinen,H., Kanai,Y.M.T., Okamoto,S., & Hibi,T.

(2010). Monocyte Chemoattractant Protein-1 Contributes to Gut Homeostasis and Intestinal Inflammation by Composition of IL-10–Producing Regulatory Macrophage Subset. *J Immunol*, 184:2671-2676.

Udani, J.; Hardy, M., & Madsen, DC. (2004). Blocking carbohydrate absorption and weight loss: a clinical trial using a proprietary fractionated white bean extract. *Altern. Ther. Health Med.*, v. 9, p. 63-69.

Vasconcelos, I.M., & Oliveira, J.T. (2004). Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, v. 44, p. 385-403.

Yoshimura T, Robinson, E.A., Tanaka. S., Appella, E., & LEONARD E.J. (1989). Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J Immunol*, v. 142, p. 1956-1962.

Yoshimura T, & LEONARD E.J. (1990). Secretion by human fibroblasts of monocyte chemoattractant protein-I, the product of gene JE. *J Immunol*, v. 144, p. 2377-2383.

Yoder, J.M.; Aslam,R.U., & Mantis, N.J. (2007). Evidence for Widespread Epithelial Damage and Coincident Production of Monocyte Chemotactic Protein 1 in a Murine Model of Intestinal Ricin Intoxication. *Infection and Immunity*, Apr., p. 1745–1750.

Weinman, M. D., Allan, C. H., Trier, J. S., & Hagen, S. J. (1989). Repair of Microvilli in the Rat Small Intestine After Damage With Lectins Contained in the Red Kidney Bean. *Gastroenterology*, v. 97, p. 1193-204.

Zucoloto, S., Scaramello, AC., Lajolo, FM., & Mucillo, G. (1991). Effect of oral phytohaemagglutinin intake on cell adaptation in the epithelium of the small intestine of the rats. *Int. J. Exp. Path*, v. 72, p. 41-45.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Perspectivas

- Verificar possíveis efeitos das doses do EFFB em fígado e pâncreas coletados após eutanásia dos animais e preservados em parafina e resina.
- Verificar possíveis efeitos ultraestruturais das doses do EFFB em segmentos do intestino delgado coletados e processados para microscopia eletrônica de transmissão.
- Testar dose da FFB que tenha efeito terapêutico, como suplemento dietético, no tratamento da perda de peso corporal.
- Testar a lectina purificada da FFB pode causar efeitos similares aos observados neste estudo *in vivo*, visto que a FFB contém outros fatores antinutricionais.