



**UFOP**

Universidade Federal  
de Ouro Preto

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**

**ESCOLA DE NUTRIÇÃO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E NUTRIÇÃO**

**ÁREA: BIOQUÍMICA E FISIOPATOLOGIA DA NUTRIÇÃO**



“Potencial do feijão (*Phaseolus vulgaris*) na redução de lipídios séricos e de danos oxidativos hepáticos em ratos alimentados com dieta hiperlipídica”

Josilene Lopes de Oliveira

Ouro Preto, MG

2018

**Josilene Lopes de Oliveira**

**“Potencial do feijão (*Phaseolus vulgaris*) na redução de lipídios séricos e de danos oxidativos hepáticos em ratos alimentados com dieta hiperlipídica”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde e Nutrição, área de concentração: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lucia Pedrosa. Universidade Federal de Ouro Preto

Co-orientadora: Joyce Ferreira da Costa Guerra – Universidade Federal de Uberlândia

Ouro Preto – MG

2018

O482p

Oliveira, Josilene Lopes.

Potencial do feijão (*Phaseolus vulgaris*) na redução de lipídios séricos e de danos oxidativos hepáticos em ratos alimentados com dieta hiperlipídica [manuscrito] / Josilene Lopes Oliveira. - 2018.

66f.: il.: grafs; tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. MSc<sup>a</sup>. Maria Lucia Pedrosa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Departamento de Nutrição . Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição .

Área de Concentração: Saúde e Nutrição.

1. Feijão - Dissertação. 2. Obesidade - Dissertação. 3. Estresse oxidativo - Dissertação. I. Pedrosa, Maria Lucia. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 613.2





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
Escola de Nutrição – ENUT  
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos seis dias do mês de abril de dois mil e dezoito, às catorze horas e trinta minutos, no Auditório da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna **Josilene Lopes de Oliveira**. A Banca Examinadora, definida anteriormente, foi composta pelos professores Eleonice Moreira dos Santos (UFOP), Silvana Mara Luz Turbino Ribeiro (UFOP) e Maria Lúcia Pedrosa. Dando início ao exame, a aluna apresentou sua Dissertação de Mestrado intitulada: **"Potencial do feijão (*Phaseolus vulgaris*) na redução de lipídios séricos e de danos oxidativos hepáticos em ratos alimentados com dieta hiperlipídica"**. Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento do Programa. Após julgamento, os membros da Banca decidiram por:



APROVAR



APROVAR CONDICIONALMENTE



REPROVAR

Profa. Silvana Mara Luz Turbino Ribeiro (UFOP),  
Examinadora Externa

Profa. Eleonice Moreira dos Santos (UFOP),  
Examinadora Interna

Profa. Maria Lúcia Pedrosa,  
Orientadora

Josilene Lopes de Oliveira,  
Mestranda

## **AGRADECIMENTO**

Á minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Lucia Pedrosa, a co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Joyce Ferreira da Costa Guerra e ao Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva por todo o ensinamento, palavras de estímulo, por partilharem seus conhecimentos e me guiarem pelo caminho do aprendizado e da pesquisa. Vocês são exemplos de profissionais. Sou muito grata por terem me acolhido tão bem!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Saúde e Nutrição pelos ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório, Alice Helena, Ana Maria Viana, Juliana Lopes, Mariana Albuquerque, Mayara Carvalho, Nara Lage e Renata Pereira pelos ensinamentos e parceria durante esse ano.

Aos estagiários: Jonathas Assis, Luiz Menezes e Júlia Rossi que além de estagiários e parceiros no desenvolvimento desse trabalho, se tornaram grandes amigos.

**Apoio financeiro: CAPES, UFOP, CNPq e FAPEMIG**

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Agradeço a Deus por me iluminar a cada dia e pela vida maravilhosa que Ele me deu.

Aos meus pais, Aparecida e Geraldo, por dedicarem cada instante de suas vidas para minha felicidade, sem dúvida vocês são meus grandes mestres e motivo de toda minha admiração!

Aos meus irmãos, por toda atenção, companheirismo, risadas e todo tipo de suporte que se possa imaginar.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ALT** - Alanina aminotransferases

**ANOVA** - Análise de variância

**AOAC:** *Association of Official Agricultural Chemists*

**AST** - Aspartato aminotransferase

**C** - Grupo de animais que receberam dieta padrão

**CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais

**CF** - Grupo de animais que receberam dieta padrão acrescida de 10% de feijão

**CT** - Colesterol total

**DNPH** - 2,4 dinitrofenilhidrazina

**DPPH** - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

**DTNB** - Ácido 5,5`-ditiobis -[2- nitrobenzóico]

**EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético

**GSSG** - Glutationa oxidada

**GSH** - Glutationa total

**H** - Grupo de animais que receberam dieta hiperlipídica

**HDL** - *High Density Lipoproteins*

**HF** - Grupo de animais que receberam dieta hiperlipídica acrescida de 10% de feijão

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio

**IDL** - *Intermediate density lipoprotein*

**LABNEX** - Laboratório de Nutrição Experimental

**LDL** - *Low Density Lipoprotein*

**MDA** - Malondialdeído

**SDS** - Dodecil sulfato de sódio

**SOD:** Superóxido dismutase

**TBA** - Ácido tiobarbitúrico

**TBARS** - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TCA** - Ácido tricloroacético

**TEA** - Trietanolamina

**TG** - Triacilgliceróis

**TNB** - ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

**Trolox** - 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

**VLDL** - *Very Low Density Lipoproteins*



## RESUMO

A obesidade é uma comorbidade que pode desencadear o surgimento de várias doenças metabólicas, como resistência à insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia, esteatose hepática, hipertensão e doenças cardiovasculares. O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma leguminosa amplamente consumida no mundo todo, seus grãos são importante fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais. Eles possuem também, compostos fenólicos que são antioxidantes que podem evitar o início ou a propagação das reações de oxidação em cadeia, além disso, têm demonstrado atividade anti-inflamatória, alguns polifenóis atuam, também, na redução de lipídios hepáticos e séricos e podem minimizar a oxidação da LDL. Adicionalmente, os feijões contêm fibras, amido resistente, ácido fítico, e outros compostos considerados bioativos. O objetivo deste trabalho foi avaliar, em ratos, se a farinha de feijão (*Phaseolus vulgaris*) corrige as alterações de metabólitos séricos e de danos oxidativos hepáticos desencadeados por dieta hiperlipídica. Foram realizadas análises *in vitro* para verificar a capacidade antioxidante e quantificação de polifenóis e flavonoides de quatro tipos de feijões. Posteriormente foi realizado o experimento animal, com quatro grupos: C (Controle), CF (Controle com 10% de feijão), H (Hiperlipídico), HF (Hiperlipídico com 10% de feijão) e análises bioquímicas, de enzimas antioxidantes e de danos celulares. Os resultados *in vitro* mostraram que o feijão é uma importante fonte de polifenóis e capacidade antioxidante. Os resultados do estudo *in vivo* mostraram que a adição da farinha de feijão vermelho à dieta hiperlipídica reduz a massa de tecidos adiposos, os níveis de colesterol, glicose e triacilgliceróis e indicou um efeito antioxidante. Em conjunto nossos resultados confirmam efeitos benéficos dessa leguminosa, fortalecem a ideia que seu consumo deve ser estimulado e abre perspectivas para estudos posteriores.

## **ABSTRACT**

Obesity is a comorbidity that can trigger the onset of many metabolic diseases, such as insulin resistance, type 2 diabetes, dyslipidemia, hepatic steatosis, hypertension and cardiovascular diseases. The Common bean (*Phaseolus vulgaris*) is a widely consumed legume in the world, it is an important source of protein, carbohydrates, vitamins and minerals. *Phaseolus vulgaris* bean also have phenolic compounds that are antioxidants, which might be the first or the propagation of chain oxidation reactions; in addition, they have anti-inflammatory activity. Some polyphenols also act to reduce hepatic and serum lipids, and are responsible of preventing an oxidation of LDL. Moreover, fibers, resistant starch, phytic acid and other compounds considered bioactive are found. The objective of this study was to evaluate, in rats, the action of bean's flour corrected as metabolic alterations and of hepatic oxidation triggered by a hyper lipid diet. Our experiment were analyzed in vitro to verify the antioxidant capacity and quantification of polyphenols and flavonoids of four types of beans. The experiment was carried out with four groups: C (Control), CF (Control with 10% of beans), H (High fat), HF (High fat with 10% of beans). Biochemical analyzes of antioxidant enzymes and cell damage were performed. The in vitro results of the bean are an important source of polyphenols and antioxidant capacity. The results of the experiment in vivo study showed that the addition of the red bean's flour in the high fat diet decreased the mass of adipose tissues, cholesterol, glucose and triglyceride levels, and it had an antioxidant effect. Our results confirm the beneficial effects of this legume, and strengthen the idea that its consumption should be stimulated and open perspectives for further studies.

# 1 SUMÁRIO

2	INTRODUÇÃO	1
3	OBJETIVOS	3
3.1	Objetivo geral	3
3.2	Objetivos específicos	3
4	REVISÃO DA LITERATURA	4
4.1	ESTRESSE OXIDATIVO	4
4.2	OBESIDADE	5
4.3	DISLIPIDEMIA	6
4.4	RESISTÊNCIA À INSULINA	6
4.5	ESTEATOSE HEPÁTICA	7
4.6	O FEIJÃO	7
4.6.1	Carboidratos	8
4.6.2	Proteínas	9
4.6.3	Lipídios	10
4.6.4	Fatores antinutricionais e compostos bioativos	10
4.6.5	Polifenóis	11
4.6.6	Fibra dietética	13
4.6.7	Amido resistente	13
4.6.8	Saponinas	13
4.6.9	Ácido fítico	14
5	MATERIAIS E MÉTODOS	15
5.1	Amostras de Feijão	15
5.2	Composição centesimal	15
5.3	Composição de Polifenóis Totais	16
5.4	Capacidade antioxidante in vitro do feijão	16

5.5	Quantificação de Flavonoides	17
5.6	Composição das dietas	17
5.7	Desenho experimental	18
5.8	Delineamento experimental	19
5.9	Avaliação de metabólitos e enzimas séricas	20
5.10	Avaliação de defesas antioxidantes e de marcadores do dano oxidativo em tecido hepático	20
5.10.1	Atividade da catalase	20
5.10.2	Glutathiona total	21
5.10.3	Glutathiona Peroxidase e Glutathiona Redutase	22
5.10.4	Proteína carbonilada	25
5.10.5	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	25
5.10.6	Proteínas totais em tecidos	26
5.11	Determinação de gordura no fígado.	27
5.12	Determinação de gordura nas fezes	27
5.13	Análises estatísticas	28
6	RESULTADOS	29
7	DISCUSSÃO	37
8	CONCLUSÃO:	44
9	REFERÊNCIAS	45

## 2 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma comorbidade que pode desencadear o surgimento de várias doenças metabólicas, como resistência à insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia, esteatose hepática, hipertensão e doenças cardiovasculares (EVERARD & CANI, 2013).

Alterações lipídicas, causadas pela obesidade, tem um papel importante na etiologia dessas doenças (KLOP, ELTE, & CASTRO CABEZAS, 2013). Outro fator envolvido no desenvolvimento de complicações associadas à obesidade é o estresse oxidativo. Múltiplos marcadores do estresse oxidativo estão sendo apontados como preditores de eventos cardiovasculares e diabetes (STROBEL et al. 2011).

Para auxiliar na redução dos fatores de risco que aumentam a chance do surgimento de doenças em indivíduos obesos, tem sido indicado o consumo de alimentos que tenham efeito na manutenção de níveis adequados de lipídios sanguíneos e na redução de danos oxidativos, estudos mostram que algumas espécies de feijão podem cumprir esse papel (HAIZHAO, 2016).

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma leguminosa amplamente consumida no mundo todo, correspondendo a quase metade dos grãos de leguminosas ingeridas (MOSCA, 2014). Seus grãos são importante fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais (BROUGHTON et al., 2003) e também apresentam compostos fenólicos (XU; CHANG, 2009). Compostos fenólicos são agentes antioxidantes que podem evitar o início ou a propagação das reações de oxidação em cadeia, além disso, têm demonstrado atividade anti-inflamatória (ROSA, 2001). Alguns polifenóis atuam, também, na redução de lipídios hepáticos e séricos e podem minimizar a oxidação da LDL (Low Density Lipoprotein) (PEREIRA, 2016). Adicionalmente, os feijões contêm fibras, amido resistente e ácido fítico, e outros compostos considerados bioativos. As fibras são classificadas como solúveis e insolúveis, no *Phaseolus vulgaris* encontramos maior quantidade de fibras insolúveis (MARTÍN-CABREJAS et al., 2004). Elas aumentam o bolo fecal, diminuindo a absorção de lipídios, já as fibras solúveis sofrem fermentação no intestino grosso, produzindo ácidos graxos de cadeia curta que são absorvidos e promovem alterações no metabolismo de lipídios (COHN, et al., 2010). Da mesma forma, o amido resistente ao sofrer fermentação no cólon, gera ácidos graxos de cadeia curta, que absorvidos podem influenciar o metabolismo hepático de lipídios

(DARZI, 2011) essas alterações no metabolismo de lipídios pode causar uma redução da concentração desses nutrientes no plasma. Já o ácido fítico, reduz a glicemia possivelmente por inibir a  $\alpha$ -amilase, diminuindo a velocidade de absorção de glicose (THOMPSON, 1988). Portanto, o *Phaseolus vulgaris* pode se tornar um importante aliado na redução de fatores que aumentam a chance do surgimento de doenças associadas à obesidade (HAIZHAO, 2016).

Mesmo diante de potencial efeito benéfico, o consumo dessa leguminosa tem diminuído ano após ano, em grande parte por causa da industrialização e urbanização. Por outro lado, a ingestão de alimentos hipercalóricos e gordurosos vem aumentando constantemente. Assim, é essencial que se estabeleçam benefícios específicos, para valorizar o consumo dos feijões, não somente como fonte de macronutrientes e micronutrientes importantes, mas também como fonte de compostos que auxiliam na diminuição do risco de doenças e agravos crônicos.

Neste contexto, o objetivo foi verificar se o feijão (*Phaseolus vulgaris*) pode corrigir alterações de metabólitos séricos e danos oxidativos desencadeados por dieta hiperlipídica. Os resultados poderão estimular outros estudos e ajudar a estabelecer seus efeitos benéficos, fazendo com que seu consumo seja mais estimulado.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar, em ratos, o potencial da farinha de feijão (*Phaseolus vulgaris*) na correção das alterações de metabólitos séricos e de danos oxidativos hepáticos desencadeados por dieta hiperlipídica.

### **3.2 Objetivos específicos**

A. Determinar a composição centesimal, compostos fenólicos e a capacidade antioxidante “in vitro” dos feijões Adzuki, Cariquinha, Preto e Vermelho, encontrados no comércio da cidade de Ouro Preto.

B. Avaliar se a adição da farinha de feijão à dieta padrão e à hiperlipídica afeta:

- o consumo alimentar e massa corporal;
- as massas dos tecidos adiposos;
- a massa do fígado e marcadores séricos da função hepática;
- a glicemia e os lipídios séricos;
- o perfil de antioxidantes e os marcadores de danos oxidativos no fígado;

## **4 REVISÃO DA LITERATURA**

### **4.1 ESTRESSE OXIDATIVO**

O estresse oxidativo se dá quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, que são compostos oxidantes, e as defesas realizadas pelo sistema antioxidante (BARBOSA et al., 2010).

Espécies reativas de oxigênio são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em seu último orbital (radicais livres) ou moléculas instáveis com grande potencial para a geração de radicais livres como o peróxido de hidrogênio. Essa característica de possuir elétrons livres ocasiona uma instabilidade muito grande, fazendo com que essas moléculas reajam facilmente com outras moléculas. (HALLWELL E GUTTERIDGE, 2015; NELSON, 2011).

Espécies reativas de oxigênio modulam vias que controlam funções biológicas importantes. Tais vias regulam transcrição de genes e apoptose. Mas gerados em excesso podem provocar danos por induzir alterações em lipídios (LI et al., 2008). Para evitar tais danos, existem sistemas de defesa que controlam sua produção, um sistema enzimático composto pelas enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase e um sistema não enzimático composto por alguns micronutrientes como as vitaminas A, C e E. O cobre-zinco, manganês e selênio atuam de forma indireta, como cofatores das enzimas antioxidantes (CHANNON e GUZIK, 2002).

As complicações relacionadas à obesidade vêm crescendo de forma constante e o estresse oxidativo é apontado como um mecanismo molecular importante na evolução desses agravos (STROBEL, 2011).



## **4.2 OBESIDADE**

A obesidade é caracterizada, entre outros fatores, por hábitos alimentares anormais e prejudiciais. Essa comorbidade está associada com redução qualidade de vida e expectativa de vida. Ela exerce um impacto significativo e social na vida de um indivíduo (FLEMMING, 2013).

A obesidade deve ser reconhecida e tratada como uma enfermidade, pois é uma condição complexa e multifatorial (FLEMMING, 2013), e pode promover o desenvolvimento de diversas doenças metabólicas, como diabetes tipo 2, dislipidemia, esteatose hepática, hipertensão e doenças cardiovasculares (EVERARD & CANI, 2013; REUTER et al, 2015) mortalidade precoce (ENGELAND, 2003). Assim, a detecção e o tratamento precoce podem levar a grandes benefícios para a saúde.

Nos países em desenvolvimento há um rápido aumento da obesidade e do excesso de peso. Isso se deve, entre outros fatores, pelas dietas ricas em grãos refinados, óleos vegetais, edulcorantes calóricos e alimentos processados (JONES, 2016).

Estudos epidemiológicos demonstram relação entre o consumo de gordura e obesidade. Elevado consumo energético associado aos altos níveis de lipídios na dieta, está relacionado às adaptações metabólicas, que poderiam induzir o ganho de peso (COOLING & BLUNDELL, 1998).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2009), a obesidade será responsável por cerca de 5 milhões de óbitos em 2020, quase o dobro do registrado em 2011. Isso faz com que essa enfermidade seja considerada como um grave problema de saúde pública.

A realização de um estudo que relatou os efeitos da obesidade sobre a saúde em 195 países, por 25 anos, mostrou que em 2015 107,7 milhões de crianças no mundo eram obesas. Entre os anos de 1980 e 2015 houve um aumento de 20% na prevalência de obesidade em meninos e meninas (COHEN, 2017).

### **4.3 DISLIPIDEMIA**

A dislipidemia é uma desordem comum na população ocidental. Ela é caracterizada pela alteração dos níveis considerados normais de lipídios sanguíneos, na maioria das vezes ocorre elevação de colesterol total ou triacilgliceróis (STONE et al., 2013). Ela ocorre devido a fatores genéticos e ambientais (FRANCA, 2006). O seu tratamento geralmente engloba a prática regular de exercício físico, alimentação adequada associada, ou não, ao tratamento farmacológico (ACCIOLY, 2012).

As lipoproteínas plasmáticas são agregadas supramoleculares, possuem um núcleo composto por lipídios apolares, que é envolto por uma monocamada de lipídios anfipáticos, as quais estão associadas a apolipoproteínas. As lipoproteínas apresentam função de transporte de lipídios em nível plasmático, e distribuição aos tecidos, são classificadas como quilomícrons, LDL (*Low Density Lipoproteins*), HDL (*High Density Lipoproteins*), VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*) e IDL (*Intermediate Density Lipoproteins*). Essa classificação feita é de acordo com as propriedades físico-químicas de cada uma (CHAMP, 2000).

A elevação dos níveis de algumas lipoproteínas pode aumentar o risco para doenças cardiovasculares, enquanto a elevação do HDL diminui esse risco. Por outro lado, a maior proporção da fração colesterol-LDL está relacionada ao aumento de risco cardiovascular. A LDL atravessa a camada endotelial dos vasos, acumula-se na íntima das artérias e pode sofrer danos oxidativos, como resultado, desencadear a formação da placa de ateroma, e aumentando assim o risco cardiovascular (CAMBRI, 2006).

### **4.4 RESISTÊNCIA À INSULINA**

A resistência à insulina é descrita como uma das principais alterações metabólicas da obesidade (GALVÃO 2012). Indivíduos com excesso de peso corporal e que apresentam maior proporção de tecido adiposo produzem hormônios e citocinas, como resistinas, interleucinas (IL-6 e fator de necrose tumoral), que aumentam a resistência à insulina por diminuir a capacidade de captação celular de glicose (AGUIAR 2013).

Esse estado de resistência ocorre quando há uma diminuição da capacidade dos tecidos para responder a ação da desse hormônio. A insulina promove o armazenamento de triacilgliceróis no tecido adiposo por mecanismos como: aumento da absorção de

glicose e ácidos graxos propicia a diferenciação do pré-adipócito em adipócito, inibe a lipólise (KAHN, 2000).

#### **4.5 ESTEATOSE HEPÁTICA**

A Doença Hepática Gordurosa não Alcólica é uma doença hepática, mais prevalente em indivíduos ocidentais, nesses países a prevalência é de 11 a 46% e em indivíduos obesos e diabéticos esse valor é ainda maior (CAVE et al., 2007). O aumento da prevalência dessa doença está ocorrendo em todas as faixas etárias, grupos raciais, étnicos e gênero (CARVALHEIRA e SAAD, 2006).

Estudos mostram que a obesidade, o Diabetes Mellitus e a resistência insulínica podem favorecer o desequilíbrio entre a síntese e a degradação de lipídios no fígado (BENCHIMOL, 2007). Pelas suas vias normais, os ácidos graxos livres, não se acumulam no fígado, eles vão apenas circular entre os hepatócitos e as células do tecido adiposo. Quando ocorre uma elevação da síntese endógena de ácidos graxos e a secreção de lipoproteína de densidade muito baixa e beta oxidação não for suficiente para controlar esse aumento, pode ocorrer o acúmulo de triacilglicerol nos hepatócitos (GAEMERS, 2006).

Ocorrendo o acúmulo de gordura nos hepatócitos, há uma maior vulnerabilidade celular ao segundo “hit”, que pode ser de origem genética ou ambiental e pode levar a necrose e apoptose celular (DAY, 1998). O segundo “hit” se daria por estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inflamação, isso pode gerar danos ao tecido hepático (ENJOJI *et al.*, 2012).

Os antioxidantes, como flavonoides, polifenóis e taninos podem eliminar os intermediários de radicais livres inibindo as reações oxidativas em cadeia (JEON et al., 2012; PAREDES et al., 2009). Portanto alimentos contendo antioxidantes podem ser importantes para evitar a progressão de doenças associadas à obesidade.

#### **4.6 O FEIJÃO**

Feijão é um nome comum para uma grande variedade de sementes de plantas de alguns gêneros da família Fabaceae. A espécie *Phaseolus vulgaris* é a mais consumida na forma de grãos maduros e possui grande variedade de forma, cor e tamanho (CARNEIRO, 2005).

Nos dias atuais, o feijão é tido como uma das leguminosas mais importantes do mundo representando importante fonte de nutrientes para mais de 300 milhões de pessoas em alguns locais da América Latina e África (BLAIR, 2010).

O Brasil se destaca por ser o maior consumidor e produtor mundial dessa leguminosa (CONAB, 2012), e esse consumo é maior na zona rural, quando comparado com a zona urbana. No entanto, de acordo com dados do IBGE (2011), os brasileiros diminuíram o consumo per capita de arroz e feijão. Como possíveis fatores que levaram a essa modificação está o êxodo rural, levando a modificações de hábitos alimentares, chegada dos “fast foods”, devido também às alterações no preço desses produtos e a disponibilidade de tempo requerida para prepará-lo (TARDIDO; FALCÃO, 2006).

Os feijões são considerados uma importante fonte de vitaminas (AUGUSTIN et al., 2000). Eles possuem vitaminas hidrossolúveis como riboflavina (0,136 a 0,266 mg/100g), niacina (1,16 a 2,68 mg/100g), tiamina (0,86 a 1,14mg/100g), vitamina B6 (0,336 a 0,636 mg/100g) e ácido fólico (0,171 a 0,579 mg/100g), Por outro lado, possui baixas quantidades de vitamina C e hidrossolúveis (GEIL, 1994).

A composição nutricional de 3 variedades de feijões (*Phaseolus Vulgaris*) encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição centesimal média (g/100 g) de feijão cozido.

Componentes	Feijão Carioca	Feijão Preto	Feijão Vermelho
Carboidratos	13,6	14	12,9
Proteínas	4,8	4,5	5,7
Lipídios	0,5	0,5	0,5
Umidade	80,4	80,2	80
Cinzas	0,7	0,8	0,8
Fibra alimentar	8,5	8,4	11,5
Ferro	1,3	1,5	1,4

Fonte: TACO (2011)

#### 4.6.1 Carboidratos

O teor de carboidratos varia muito, de acordo com a variedade de feijão (COSTA DE OLIVEIRA et al., 2001), o amido, fibras (pectina, gomas e mucilagens, celulose e hemicelulose) e  $\alpha$ -galactosilos (rafinose, estaquiose e verbascose) são os principais carboidratos presentes nos feijões (RAMIREZ-CÁRDENAS et al., 2008).

Dois tipos de fibras dietéticas são bem caracterizadas no grão de feijão (SHIGA E LAJOLO, 2006). A insolúvel é representada pela celulose, hemicelulose e lignina que melhoram os movimentos no trânsito intestinal. Enquanto a parte solúvel consiste em oligossacarídeos, glucanos e gomas galactomananas que auxiliam na redução do colesterol sanguíneo e na regulação dos níveis de glicose no sangue (RODRIGUEZ et al., 2006). O fato de o feijão possuir essas fibras faz com que ele seja útil no controle da liberação lenta de carboidratos (JENKINS, 2007).

O amido é o principal carboidrato encontrado no feijão, amilose e amilopectina são as duas principais formas de amido presentes nessa leguminosa (ZHOU et al., 2004). Comparando-se a digestibilidade do amido de feijões e cereais, o primeiro apresenta digestibilidade muito inferior (HOOVER E SOSULSKI, 1985). O feijão possui alto teor de amilose e conseqüentemente alto teor de amido resistente (TOVAR E MELITO, 1996). O alto teor de fibras presente nessa leguminosa, os fatores antinutricionais também afetam o grau de digestibilidade do amido (ZHOU et al., 2004).

Os  $\alpha$ -galactosídeos presentes no feijão não são digeríveis pelo ser humano devido à ausência da enzima  $\alpha$ -galactosidase, isso faz com que esses compostos se acumulem no intestino (COSTA DE OLIVEIRA et al., 2001), sendo fermentados e levando a produção de gases (PEYRIN-BIROULET; BIGARD, 2005). A quantidade dos  $\alpha$ -galactosídeos varia de acordo com a variedade de feijão. As variedades pretas e vermelhas contêm menor quantidade desses compostos quando comparada aos feijões brancos (NACZK et al., 1997).

#### **4.6.2 Proteínas**

O grão pode conter de 16 à 33% de proteína dependendo da variedade (OSBORN et al., 1988). Porém as proteínas possuem baixa disponibilidade de aminoácidos sulfurados (PEREIRA; COSTA, 2002).

A digestibilidade das proteínas do grão de feijão está entre 50 a 80%, variando de acordo com suas variedades (HUGHES et al., 1996). Estudos mostram que as proteínas do feijão branco possuem melhor digestibilidade comparada àquelas dos feijões mais escuros (BRESSANI et al., 1991).

A baixa digestibilidade proteica do feijão se deve à presença de inibidores de proteases, deficiência de aminoácidos sulfurados e presença de compostos antinutricionais (WU et al., 1995). Um dos fatores que ajuda a aumentar a digestibilidade é o cozimento dessa leguminosa, pois esse processo inativa os inibidores

de proteases, melhorando a sua digestibilidade proteica (ANTUNES et al., 1995; NERGIZ E GOKGOZ, 2007).

O feijão é pobre em aminoácidos sulfurados, cisteína e principalmente metionina (GUZMÁN-MALDONADO et al., 2000; PIRES ET AL., 2006). Porém essa leguminosa apresenta quantidades elevadas de lisina e leucina (CHANG, 1981). As principais proteínas do feijão são as albuminas e as globulinas (DEL PINO e LAJOLO, 2003; ADEBOWALE et al., 2007). Esse grão contém proteases, lectinas e inibidores de  $\alpha$ -amilase (CHIARADIA e GOMES, 1997). Esses compostos com características antinutricionais, são eliminados quando submetidos a alguns processos, como por exemplo, imersão em água e cozimento (CARBONARO et al., 2000). Isso pode explicar o aumento da qualidade da proteína após o cozimento em imersão de água (SHIMELIS e RAKSHIT, 2007). Antunes et al. (1995) mostrou que a maceração realizada por 12 horas pode aumentar a digestibilidade da proteína de 43,3 à 63,7%.

#### **4.6.3 Lipídios**

Os fosfolipídios e os triacilgliceróis são os principais componentes lipídicos dos feijões (YOSHIDA et al., 2005). Essa leguminosa possui os ácidos graxos como o ácido palmítico, oleico e linoleico, este último encontra-se em maiores concentrações (GRELA E GUNTER, 1995).

#### **4.6.4 Fatores antinutricionais e compostos bioativos**

Além dos macros e micronutrientes, o feijão cru possui vários componentes antinutricionais tais como: inibidores de tripsina, lectinas, fitatos, compostos fenólicos e oligossacarídeos não digeríveis, que restringem seu consumo. O consumo de fatores antinutricionais pode causar alguns efeitos adversos, como balanço nitrogenado reduzido, diminuição da absorção intestinal de açúcares e aminoácidos e alterações da resposta imune (VALLE VEGA; FLORENTINO, 2000).

Os fatores antinutricionais influenciam na qualidade da proteína dos alimentos, como relacionado no item 5.2.1.2, no feijão as diferentes variedades possuem diferentes quantidades desses fatores (GENOVESE; LAJOLO, 2001).

Os fitoquímicos do feijão, como os compostos fenólicos possuem propriedades antioxidantes e têm um grande potencial como ingrediente funcional e nutracêutico (DINELLI et al., 2006).

#### 4.6.5 Polifenóis

O *Phaseolus vulgaris* apresenta conteúdo expressivo de polifenóis, que por sua vez possuem características antioxidantes, estes compostos vêm sendo sugeridos como agentes capazes de reduzir o estresse oxidativo (LAJOLO, 1996).

Os polifenóis são compostos que possuem pelo menos 1 anel aromático e apresentam um ou mais grupamentos hidroxila, como mostrado na Figura 1. Esses compostos são responsáveis pela pigmentação das plantas (ANGELO 2007), nas leguminosas e cereais eles estão na cobertura da semente, no caso do feijão ele está em maior quantidade na casca e quantidades mínimas nos cotilédones (SATHE e SALUNKHE, 1984, DE MEJIA et al., 1999).

Os polifenóis presentes nas leguminosas são em sua maioria, do tipo flavonoides, compostos por antocianinas, flavonas, flavonóis, flavanonas e isoflavonas (BENINGER E HOSFIELD, 2003). Estes compostos têm sido apontados como importantes agentes da promoção da saúde e as pesquisas mostram que os flavonoides possuem uma variedade de propriedades biológicas, como antialérgicos, anti-inflamatórios, antiproliferativas, anticarcinogênica, antivirais (REN, 2003) além de serem compostos antioxidantes e possuírem efeito benéfico na diminuição dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, alergias e infecções bacterianas. De maneira geral, esses compostos exibem uma gama de propriedades biológicas e farmacológicas (ZAND, 2002). Sendo assim, desempenham importante papel na saúde humana (HUANG, 1994).

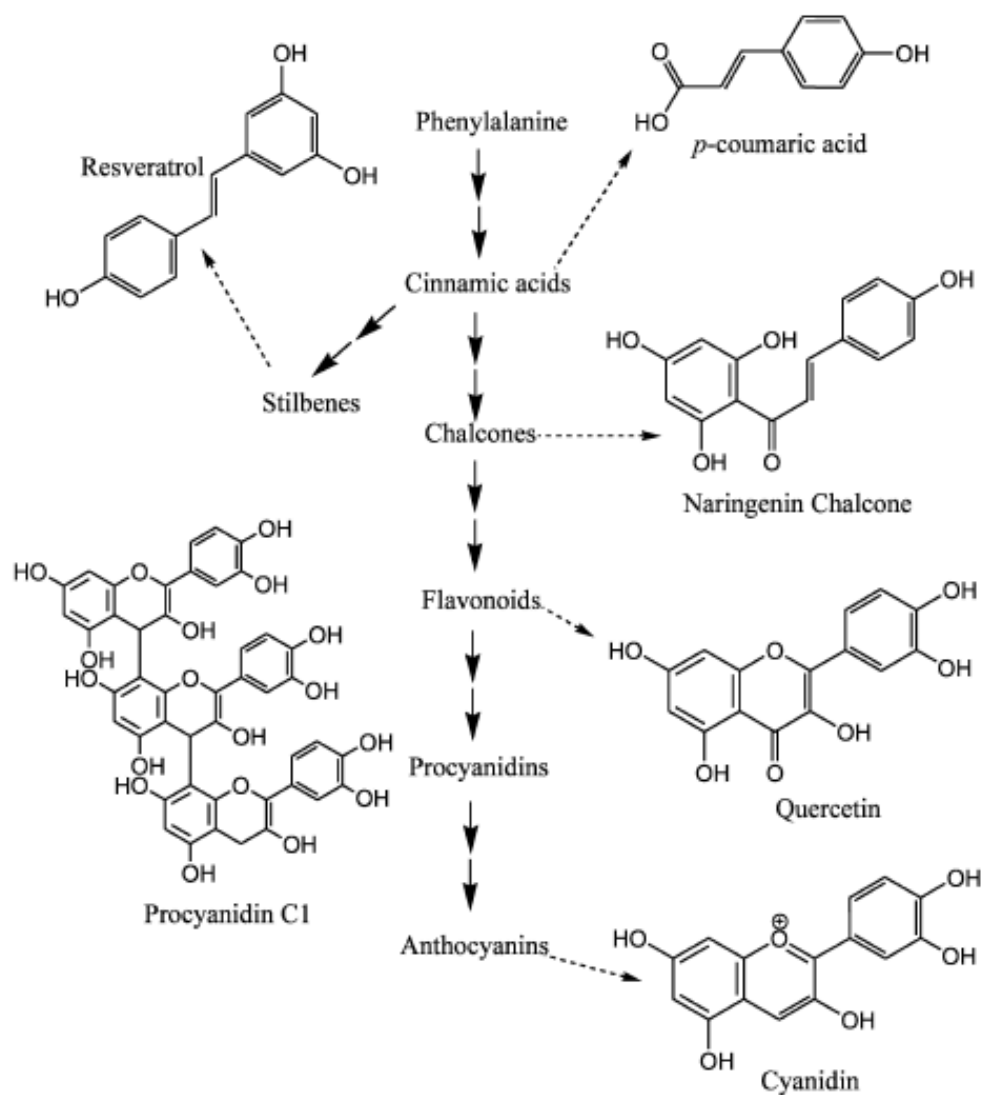


Figura 1: Resumo da principal via de biossíntese de polifenóis, com exemplos de estrutura de cada classe principal desses compostos (STEVENSON; HURST, 2007).

Os compostos fenólicos presentes nos feijões atuam como antioxidantes, uma vez que têm a capacidade de limitar o desenvolvimento de espécies iniciadoras de radicais livres por quelação de íons metálicos ou inibição de enzimas que estão envolvidas no processo de produção de radicais (ELIZABETH et al., 2007). Existe uma relação entre as estruturas de flavonoides e a sua atividade antioxidante; Quanto maior o número de grupos hidroxilas, maior seria a atividade antioxidante (CAO et al., 1997).



#### **4.6.6 Fibra dietética**

É a parte comestível de uma planta, mas que não é digerida nem absorvida no intestino delgado e sofrem fermentação no intestino grosso. Essas fibras são compostas pela celulose, hemicelulose e pectina (ANDERSON et al, 2009).

Estudos epidemiológicos mostram que a fibra dietética é responsável pela diminuição dos níveis de lipídios sanguíneos (SÁNCHEZ-MUNIZ, 2012). O efeito fisiológico das fibras é determinado pelas propriedades físico-químicas, capacidade de retenção de água e capacidade para ligar-se aos ácidos graxos (SCHNEEMAN, 2001).

Elas são classificadas em solúveis e insolúveis, de acordo com suas características, no *Phaseolus vulgaris* encontramos a fibra insolúvel em maior quantidade (MARTÍN-CABREJAS et al., 2004). Elas são responsáveis por aumentar o bolo fecal, diminuindo a absorção de lipídios, já a solúvel sofre fermentação no intestino grosso, produzindo ácidos graxos de cadeia curta que serão absorvidos e levarão a alteração do metabolismo de lipídios (COHN, et al., 2010).

#### **4.6.7 Amido resistente**

O feijão é uma leguminosa que contém quantidades significativas de amido resistente (KUTOS, et al., 2003). A quantidade desse componente varia consideravelmente entre as variedades de feijões e entre os métodos utilizados para o processamento do *Phaseolus vulgaris*, pois o tratamento térmico tem grande influência na digestibilidade e biodisponibilidade do amido (PUJOLÀ, FARRERAS & CASAÑAS, 2007).

O amido resistente possui propriedade de fermentação no cólon, formando os ácidos graxos de cadeia curta, que são absorvidos e levados até o fígado, podendo influenciar no metabolismo de lipídios. O amido resistente retarda a absorção de gorduras, podendo influenciar positivamente no aparecimento e/ou progressão de dislipidemias. Essa característica se deve ao fato desse componente promover maior saciedade (DARZI, 2011) e aumentar a excreção de esteróides, uma vez que se liga aos ácidos biliares (HAN, 2004).

#### **4.6.8 Saponinas**

São substâncias que possuem estrutura com característica anfifílica, parte da sua estrutura apresenta caráter lipofílico (triterpeno ou esteróide) e a outra parte caráter

hidrofílico (açúcar). Devido a essas características, as saponinas têm capacidade de formação de espumas (SCHENKEL et al., 2001).

Elas são formadas a partir do metabolismo secundário de plantas e atuam no sistema de defesa desses vegetais, possui propriedade antifúngica e antibacteriana (WINA et al., 2005), devido a sua capacidade de interação com os esteróis da membrana desses microrganismos (FRANCIS et al., 2002).

A saponina já foi considerada um composto citotóxico, pois pode interagir com componentes da membrana de eritrócitos, desorganizando-a, levando a hemólise dos glóbulos vermelhos (CUNHA & ROQUE, 2005). Entretanto, estudos mostraram que as saponinas não são absorvidas na corrente sanguínea e após o processo de digestão elas são encontradas no intestino delgado, ceco e colon (GESTETNER et al., 1968).

Porém, há evidências de que essas substâncias apresentem importante papel na redução do colesterol em modelos animais e estudos in vivo (CHÁVEZ-SANTOSCOY, GUTIÉRREZ-URIBE E SERNA-SALDIVAR, 2013).

#### **4.6.9 Ácido fítico**

Essa leguminosa também contém quantidades expressivas de ácido fítico. O consumo dessa substância, em pequenas quantidades se mostrou eficaz em retardar a digestibilidade do amido e diminuir a resposta glicêmica (MARTINEZ *et al.*, 2002). Dois mecanismos de ação responsáveis pelo efeito do ácido fítico têm sido propostos: seu poder de se ligar à  $\alpha$ -amilase, fazendo com que ela permaneça na sua forma inativa, e de retardar o esvaziamento gástrico, diminuindo a velocidade de absorção de glicose (THOMPSON, 1988).

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Amostras de Feijão**

Foram utilizados os feijões Adzuki, Cariquinha, Preto e Vermelho, encontrados no comércio da cidade de Ouro Preto, sendo que o cariquinha pertencia ao lote 0136, o vermelho ao lote 0034, e o preto ao lote 0860, produzidos no ano de 2016. Todos da marca Turamã ®, empacotado e distribuído por L&A INDÚSTRIAS E COMÉRCIO DE CEREAIS LTDA, Rua Sete, 167 Bairro São Sebastião – Contagem – MG.

Para obtenção da farinha de feijão os grãos ficaram de molho em água por 12 horas, na proporção de 1:3 (P/V). Essa água foi então descartada e o feijão foi submetido à cocção em água, também na proporção 1:3 (P/V), em panela de pressão durante 40 minutos. O feijão já cozido foi seco em estufa a 60°C, por 19 horas e em seguida foi triturado em liquidificador doméstico e peneirado até ser obtido um pó fino e homogêneo. Esse pó foi armazenado em frasco âmbar até a realização das análises.

### **5.2 Composição centesimal**

A composição centesimal da farinha de feijão foi realizada no Laboratório de Bromatologia da Escola de Nutrição na Universidade Federal de Ouro Preto. As análises de umidade, cinzas, proteínas e lipídios foram realizadas em triplicata.

A determinação da umidade foi realizada pelo método de secagem em estufa a 105°C, até peso constante, e em seguida as amostras foram esfriadas em dessecador e pesadas em balança de precisão (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Os lipídios totais foram extraídos com solvente éter de petróleo sob aquecimento, em extrator de Soxhlet, por aproximadamente 6 horas, conforme descrito por INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008).

O método de digestão Kjeldahl foi utilizado para determinação de nitrogênio total da amostra. Após a digestão, ocorreu a destilação da amostra e realização da titulação e logo após, o teor de nitrogênio da amostra foi convertido para proteína através de fatores de correção já estabelecidos (AOAC, 2000).

Para determinação do Resíduo Mineral Fixo, as amostras foram previamente carbonizadas em temperatura baixa na chama do bico de bunsen. O resíduo mineral fixo foi determinado por meio da calcinação das amostras em mufla com temperatura entre 550 a 600°C por aproximadamente 6 horas, em seguida as amostras foram resfriadas em

dessecador até a temperatura ambiente e depois pesadas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Por fim, a quantidade de carboidratos foi calculada pela diferença em relação à soma dos teores de proteína, lipídios totais, umidade e cinzas.

### **5.3 Composição de Polifenóis Totais**

O conteúdo de polifenóis totais da farinha de feijão foi realizado em triplicata e foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu no qual, o reagente de Folin-Ciocalteu, que é uma mistura dos ácidos fosfotungstíco ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) e fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, produzindo óxido de tungstíco ( $W_8O_{23}$ ) e molibdênio ( $Mo_8O_{23}$ ) de cor azul.

Inicialmente foi pipetado 500  $\mu$ L de amostra, do branco e de cada ponto da curva padrão, logo após, acrescentou-se 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu em todos os tubos e ficou em repouso por 2 minutos a temperatura ambiente; Logo após adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio, agitou e deixou em repouso por 15 minutos em banho-maria na temperatura de 50 °C e resfriado em gelo logo em seguida. A leitura foi feita no comprimento de onda de 760nm (GEORGÉ et al., 2005).

### **5.4 Capacidade antioxidante in vitro do feijão**

A capacidade antioxidante da farinha de feijão foi realizada em triplicata, sendo determinada através do método do DPPH (2,2-difenil-1picril-hidrazil) (BRAND-WILLIAMS et al, 1995), que baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical DPPH em solução de metanol.

Inicialmente foram adicionados em tubos de ensaio, 3,9 mL de solução de DPPH 60  $\mu$ M, dissolvidos em metanol 80%, e 100  $\mu$ L de solução com farinha de feijão em diferentes concentrações (1; 0,5 e 0,25 e 0,01 g/mL) e de água destilada (amostra controle). Utilizou-se Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) como antioxidante de referência. Do mesmo modo, foi adicionado em tubos de ensaio 3,9 mL de solução de DPPH e 100  $\mu$ L de solução de Trolox em diferentes concentrações (100, 200 e 400  $\mu$ M) em metanol 80%. Posteriormente, cada tubo foi homogeneizado e mantido na ausência de luz por 30 minutos à temperatura ambiente. A atividade foi determinada através da redução da absorbância do radical DPPH a 515nm; água destilada foi utilizada como branco e o percentual de inibição foi determinado de acordo com a equação:

$$\% \text{ inibição do radical DPPH} = (A \text{ controle } 515 - A \text{ amostra } 515 / A \text{ controle } 515) \times 100$$

Onde: A controle 515: é a absorbância da solução de DPPH mais água destilada (sem a presença de antioxidantes), obtida a 515nm. A amostra 515: é a absorbância da solução de DPPH mais a solução com farinha de feijão ou Trolox nas diferentes concentrações, obtida a 515nm.

### **5.5 Quantificação de Flavonoides**

O conteúdo de flavonoides totais foi realizado em triplicata e foi determinado pelo método colorimétrico descrito por HOSSAIN & RAHMAN (2011). Este método se baseia no uso do cloreto de alumínio, uma vez que o cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Assim, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos. Uma alíquota de 0,5 mL da amostra foi adicionada a 0,1mL de cloreto de alumínio 10%, 0,1 mL de acetato de potássio 1M e 4,3 mL de água destilada. As amostras foram homogeneizadas a temperatura ambiente e após 30 minutos a absorbância foi determinada a 415 nm em espectrofotômetro. Quercetina (0 a 100 µg/mL) foi utilizada como flavonoide padrão para a construção da curva de calibração. O branco foi preparado utilizando água destilada. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O conteúdo de flavonoides totais foi expresso como equivalentes de quercetina/100g de amostra.

### **5.6 Composição das dietas**

As dietas foram preparadas no início do experimento no Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX). Em seguida foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em geladeira à temperatura de 4°C.

A partir dos resultados obtidos com os três tipos de feijões, escolhemos o vermelho para realizar as análises in vivo, pois ele se destaca em relação a sua capacidade antioxidante. A composição da dieta é apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2** – Composição das dietas experimentais (g/kg de dieta)

Nutrientes	Dieta C	Dieta CF	Dieta H	Dieta HF
<b>Colina</b>	2,5	2,5	2,5	2,5
<b>Metionina</b>	3,2	3,2	3,2	3,2
<b>Mix de vitaminas<sub>1</sub></b>	10	10	10	10
<b>Colesterol<sub>2</sub></b>	-	-	20	20
<b>Mix de minerais<sub>3</sub></b>	35	35	35	35
<b>Farinha de feijão vermelho</b>	-	100	-	100
<b>Celulose</b>	50	50	50	50
<b>Sacarose</b>	100	100	100	100
<b>Caseína</b>	140	120	140	120
<b>Óleo de soja</b>	40	40	250	250
<b>Amido de milho</b>	619,3	539,3	389,3	309,3

1Mistura de vitaminas (expresso em mg/Kg da mistura): Acetato de retinol - 690; colecalciferol - 5; ácido *p*-amino benzóico - 10000; inositol - 10000; niacina - 4000; riboflavina - 800; tiamina HCL - 500; ácido fólico - 200; biotina - 40; cianocobalamina - 3; *dl*- $\alpha$ -tocoferol - 6700; sacarose - q.s.p. 1000.

2Colesterol puro: Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos®.

3Mistura de minerais (expresso em g/Kg da mistura): NaCl - 139,3; KI - 0,79; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 57,3; CaCO<sub>3</sub> - 381,4; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O - 4,01; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,548; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O - 0,477; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O - 0,023; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 389,0.

Fatores de conversão: proteínas 4 Kcal/g, lipídios 9 Kcal/g, carboidratos 4 Kcal/g.

## 5.7 Desenho experimental

Foram utilizados 32 ratos, fêmeas, da linhagem Fischer, com oito semanas de idade, pesando aproximadamente 140 gramas, provenientes do LABNEX. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas metálicas mantidas em ambiente arejado, com temperatura, umidade e ventilação controladas, receberam água filtrada e dieta “ad libitum” diferenciando-se apenas quanto ao tipo de dieta.

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto, sob protocolo nº 2016/48.

## 5.8 Delineamento experimental

Inicialmente 32 animais foram divididos em dois grupos experimentais, C (16 animais) e HF (16 animais) que receberam dieta padrão AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), e dieta hiperlipídica (25% de óleo de soja e 2% de colesterol), respectivamente. Após duas semanas eles foram divididos em quatro grupos, com 8 animais em cada, de acordo com a dieta recebida: dieta controle (C), dieta controle com farinha de feijão (CF), dieta hiperlipídica (H) e dieta hiperlipídica com farinha de feijão (HF).

O grupo C foi alimentado com dieta padrão AIN-93M (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993), já o grupo CF recebeu a dieta padrão com 10% de farinha de feijão. Os ratos do grupo H foram alimentados com dieta semelhante à AIN-93M, porém com 1% de colesterol e 25% de óleo de soja, e por último o grupo HF recebeu a dieta hiperlipídica com 10% de farinha de feijão.

As ratas foram distribuídas nos diferentes grupos de acordo com a massa corporal, de modo que não apresentassem diferença significativa entre as médias das massas corporais dos grupos. De acordo com o cálculo amostral realizado pelo programa BioEstat® versão 5.3, deveriam ser 8 animais por grupo, totalizando 32 ratos. Para esse cálculo, a dosagem de colesterol total foi considerada a variável de maior discrepância de resultados.

O experimento durou 10 semanas, duas foram de adaptação, os animais foram divididos em dois grupos, metade recebeu dieta controle e a outra metade recebeu dieta hiperlipídica. Nas outras oito semanas eles foram divididos em 4 grupos de 8 animais para receberem as dietas C, CF, H, HF como descrito acima. As ratas foram pesadas semanalmente em balança Mettler PC 4000®.

A ingestão alimentar e a excreção fecal foram avaliadas na sexta semana de experimento. Para realização desse controle, foram colocadas bandejas de papel sob cada uma das gaiolas e elas foram trocadas diariamente. A bandeja com fezes e dieta foi levada para a estufa onde ficou por 1 hora à 90°C. Logo após elas foram raspadas, para fazer a separação e pesagem das fezes e da dieta desperdiçada. A quantidade de dieta oferecida ao animal também foi pesada diariamente.

As fezes foram pesadas e armazenadas para posterior realização das análises de gordura e colesterol fecais.

Ao final do experimento, os animais foram submetidos a doze horas de jejum e anestesiados com isoflurano. A coleta de sangue desses animais ocorreu por meio de incisão dos vasos sanguíneos adjacentes ao plexo braquial até sangria total, esse material foi depositado em tubos de polipropileno. Posteriormente, foi realizada a centrifugação do sangue e o soro armazenado em *freezer* à -80°C.

Os órgãos e tecidos (coração, fígado, rins, baço, pâncreas, gordura abdominal, gordura Inguinal, Gordura Mesentérica) foram extraídos, pesados e armazenados em *freezer* à -80°C. O tecido hepático foi utilizado para avaliar a atividade das enzimas antioxidantes, marcadores de dano oxidativo e determinar o teor de lipídios, colesterol e triacilgliceróis. Parte do fígado foi armazenada em formol para análise morfométrica do órgão.

## **5.9 Avaliação de metabólitos e enzimas séricas**

O soro foi utilizado para diversas dosagens. Foram usados *kits* comerciais da Labtest Diagnóstica SA®, Gold Analisa Diagnóstica SA® e da Doles SA® para as dosagens bioquímicas de colesterol total, colesterol HDL, triacilgliceróis, albumina, proteínas totais, glicose, ureia, ALT, AST, fosfatase alcalina, creatinina, seguindo as instruções de uso fornecidas pelos fabricantes.

## **5.10 Avaliação de defesas antioxidantes e de marcadores do dano oxidativo em tecido hepático**

### **5.10.1 Atividade da catalase**

A atividade da catalase foi determinada de acordo com Aebi (1984). Esse método baseia-se na decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela enzima observada durante 3 minutos por espectrofotometria a 240 nm.

Resumidamente, 100 mg de tecido hepático foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,2) e em seguida centrifugado a 10000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno, foi adicionado 10 µL de amostra diluída, 50 µL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) e 40 µL de água destilada. Em seguida, foi adicionado 900 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM), levando ao início da reação. As absorbâncias foram determinadas exatamente a cada minuto, durante três minutos a 240 nm em espectrofotômetro com luz UV. Água destilada foi utilizada como branco para zerar o aparelho. A atividade da



catalase foi determinada pela diminuição da absorbância em 240 nm causada pelo desaparecimento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de acordo com a Lei de Lambert Beer, onde 1 U equivale a 1 μmol de hidrólise de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto, por mL:

$$C = \frac{\text{Abs} \times 1000}{\epsilon \times \text{VA}}$$

Onde:

Abs = absorbância;

ε = coeficiente de extinção molar em unidades de 39,4 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>;

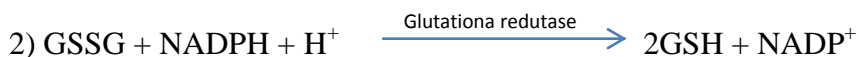
VA = volume da amostra;

C = concentração do peróxido de hidrogênio expressa em mol L<sup>-1</sup>.

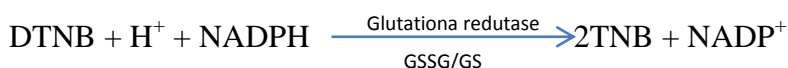
A absorbância utilizada corresponde ao delta de absorbância por minuto. Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína. Uma unidade de catalase é equivalente a hidrólise de 1 μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto.

### 5.10.2 Glutathiona total

O conteúdo de glutathiona total (GSH) e oxidada (GSSG) foi determinado em homogenato de fígado utilizando o método de reciclagem com o ácido 5,5`-ditiobis - [2-nitrobenzóico], DTNB – GSSG proposto por GRIFFITH (1980). Este ensaio utiliza um método cinético baseado na redução do DTNB a TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) que pode ser detectado espectrofotometricamente a 412nm conforme descrito nas reações abaixo:



A combinação das duas reações:



Para esse procedimento experimental, 100 mg do tecido hepático foram homogeneizados com 1 mL de ácido sulfosalicílico 5%, e em seguida centrifugado a

10000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado como amostra biológica.

Para a determinação de GSH foram adicionados 10 µL da amostra em uma microplaca, em seguida adicionaram-se 150 µL da mistura de trabalho composta por (95 mM de tampão fosfato, pH 7,0, 0,95 mM de EDTA, 48 µM de NADPH, 0.031 mg/mL de DTNB, 0.115 unidades/mL de glutathione redutase, e 0.24% de ácido de sulfosalicílico. As amostras foram então incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 µL de NADPH 0,16mg/mL foram adicionados às mesmas e o cronômetro disparado. As absorbâncias das amostras foram lidas durante 5 minutos a cada minuto, no leitor de ELISA à 412 nm.

A concentração de GSSG foi determinada através da derivatização da glutathione reduzida (GSH) presente na amostra com 2-vinilpiridina. Para isso, o sobrenadante do homogenato hepático (100 µL) foi adicionado de 2 µL de 2-vinilpiridina. O pH da solução foi ajustado para valores entre 6 e 7 utilizando trietanolamina (TEA). Após incubação por 60 minutos as amostras derivatizadas foram utilizadas no ensaio de acordo com o mesmo procedimento descrito acima.

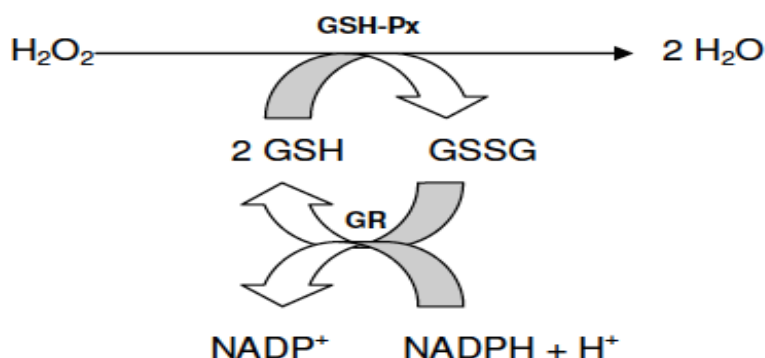
As absorbâncias de diluições seriadas de soluções padrão de glutathione reduzida e oxidada foram determinadas separadamente para obtenção das curvas de calibração. Após análise de regressão linear, foi determinado a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar as concentrações em nmoles de glutathione total e oxidada por mL de amostra.

As absorbâncias de diluições seriadas de uma solução padrão de glutathione também foram determinadas conforme descrito anteriormente, para obtenção da curva de calibração. Após esses procedimentos, foi feita a análise de regressão linear para determinar a equação da reta, que foi utilizada para determinar a concentração em nmoles de glutathione total em 10 µL de amostra, e este valor convertido para 1 mL de amostra.

### **5.10.3 Glutathione Peroxidase e Glutathione Redutase**

A atividade da glutathione peroxidase foi determinada de acordo com o método proposto por PAGLIA & VALENTINE (1967) com modificações. O método se baseia na oxidação da glutathione reduzida (GSH), catalisada pela glutathione peroxidase, acoplada a reciclagem da GSSG através da reação catalisada pela enzima glutathione

redutase que utiliza o NADPH como cofator. O decréscimo na absorvância medida a 340nm durante a oxidação do NADPH é indicativo da atividade da glutatona peroxidase.



**Figura 2.** Princípio do ensaio de determinação da atividade da Glutaciona Peroxidase.

Uma alíquota de 100 mg de tecido hepático foi homogeneizada em 1 mL de tampão Tris HCL 50mM, pH 7,0 (tampão de ensaio). Após centrifugação a 10.000g por 15 minutos a 4° C o sobrenadante foi removido e utilizado no ensaio. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 100 µL de tampão de ensaio, 10 µL de amostra e 80 µL do mix composto por 0,25mM NADPH, 2,1 mM de GSH, 0,5 U/mL de glutaciona redutase e 1mM de azida sódica. A reação foi iniciada pela adição de 10 µL de Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,2 mM, utilizado como substrato da reação. A decomposição do NADPH foi monitorada em um leitor de placas a 340 nm. Foram realizadas seis leituras, com intervalo de dez segundos entre elas. A atividade da GPx foi calculada utilizando a fórmula descrita abaixo.

$$\text{Atividade de GPx} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{3,73\mu\text{mol}/\text{min}} \times \frac{VR}{VA}$$

**Onde**

$\Delta A_{340}$  é o delta da absorvância por minuto;

3,73 é o coeficiente de extinção molar do NADPH. O valor real do coeficiente de extinção molar do NADPH em unidades de  $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  é de 6,22, no entanto este valor foi ajustado para o caminho óptico da solução em microplaca de 0,6 cm;

VR é o volume de reação em mL;

VA é o volume de amostra em mL.

Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima que causa a oxidação de 1µmol de NADPH por minuto a 25° C. A atividade específica foi expressa em unidades por mg de proteína.

A determinação da atividade enzimática da glutathiona redutase foi realizada de acordo com o método proposto por CARLBERG & MANNERVIK (1985). O ensaio é baseado na redução da glutathiona oxidada pelo NADPH na presença da glutathiona redutase.

Amostras de 100mg de tecido hepático foram homogeneizadas em 1mL de tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,5 contendo 1mM de EDTA (tampão de ensaio). Após centrifugação a 10.000g por 15 minutos a 4° C o sobrenadante foi removido e utilizado no ensaio. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 60 µL de tampão de ensaio, 100µL de GSSG 2mM e 10 µL de amostra. A reação foi iniciada pela adição de uma solução 2mM de NADPH. A atividade da glutathiona redutase foi mensurada espectrofotometricamente através da redução da absorbância causada pela oxidação do NADPH a 340 nm. Foram realizadas 11 leituras, com intervalo de dez segundos entre elas e a atividade foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\textit{Atividade de GR} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{3,73\mu\text{mol}/\text{min}} \times \frac{VR}{VA}$$

**Onde;**

$\Delta A_{340}$  é o delta da absorbância por minuto,

3,73 é o coeficiente de extinção molar do NADPH. O valor real do coeficiente de extinção molar do NADPH em unidades de  $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  é de 6,22, no entanto este valor foi ajustado para o caminho óptico da solução no well de 0,6 cm.

VR é o volume de reação em mL

VA é o volume de amostra em mL

Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima que causa a oxidação de 1µmol de NADPH por minuto a 25° C e a atividade específica foi expressa em unidades por mg de proteína.

#### 5.10.4 Proteína carbonilada

O conteúdo de proteína carbonilada nestes homogenatos foi determinado pela modificação do método de Levine et al. (1994).

Inicialmente, um fragmento de tecido hepático foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,7) e em seguida centrifugado a 10.000g por 15 minutos à 4°C o sobrenadante foi removido e utilizado no ensaio. 0,5 mL de amostra foram precipitados usando 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e centrifugado a 5000 g por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. 0,5 mL de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) e 0,5 mL HCl a 2M foram adicionados a esse precipitado e incubados à temperatura ambiente por 30 minutos, o DNPH foi acrescentado nos tubos testes e o HCl nos tubos brancos. Durante a incubação, as amostras foram misturadas vigorosamente a cada 15 minutos e os tubos testes permaneceram no escuro. Depois da incubação, 0,5 mL de TCA 10% foram adicionados e as proteínas precipitadas e centrifugadas a 5000 g por 10 minutos a 4°C. Descartamos o sobrenadante, e lavamos o precipitado duas vezes com uma mistura de acetato de etila e etanol (1:1), centrifugamos e o sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado foi dissolvido em dodecil sulfato de sódio (SDS) 6%, agitado e centrifugado a 10000 g por 10 minutos a 4°C. Para zerar o espectrofotômetro foi utilizado água destilada e as leituras das amostras, testes e brancos foram realizadas a 370 nm. O cálculo da concentração obedeceu a seguinte equação:

$$C = \frac{\text{Abs}}{22000} \times \frac{1000000}{VA}$$

Onde:

Abs = Absorbância (amostra) - Absorbância (branco)

VA = volume da amostra

#### 5.10.5 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A determinação da peroxidação lipídica se deu por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando o método de Buege e

Aust (1978). A determinação de TBARS se baseou na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídios oxidados.

Resumidamente, 100 mg do tecido hepático foram homogeneizados com 1 mL de tampão Tris HCl 20 mM (pH 7,4) e em seguida centrifugados por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. Dessa forma, 300 µL do sobrenadante do homogenato foram misturados com 300 µL de TCA. A mistura foi centrifugada a 13000 g por 10 minutos. 500 µL desse novo sobrenadante foram retirados e misturados com 500 µL de TBA e 125 µL de BHT, aquecido por 15 minutos a 95°C e imediatamente colocados em banho de gelo durante 5 minutos. Após esse tempo, a leitura foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm e a água destilada foi utilizada como branco. As concentrações de TBARS foram calculadas utilizando a equação da curva de malondialdeído (MDA) e corrigidas pelas proteínas totais e foram expressas em nmol/mg de proteína.

#### **5.10.6 Proteínas totais em tecidos**

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de Lowry et al. (1951), sendo esta análise realizada para fazer a correção da atividade da catalase e da concentração de TBARS. O princípio do método baseia-se na redução do reagente de Folin-Ciocalteu, ao reagir com aminoácidos aromáticos, catalisada por íons cobre, em meio alcalino, formando uma coloração azul.

Inicialmente foram preparadas as soluções de trabalho conforme descrito abaixo:

- Reagente A: 0,25 g de sulfato de cobre e 0,5 g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada;
- Reagente B: 5 g de carbonato de sódio e 1 g de hidróxido de sódio em 250 mL de água destilada;
- Reagente C: Em 50 mL de reagente B adicionar 1 mL de reagente A;
- Reagente D: Em 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu adicionar 1 mL água destilada.

Em tubos de polipropileno foram adicionados 100 µL da amostra diluída ou soluções padrão de albumina e água destilada (branco). Em seguida, foi adicionado 1 mL do reagente C. Os tubos foram agitados no vórtex e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 100 µL do reagente D em

todos os tubos e após 30 minutos de incubação no escuro as absorvâncias das amostras relativas ao branco foram determinadas a 660 nm.

Diluições seriadas de uma solução de concentração conhecida de albumina bovina sérica foram utilizadas para a construção da curva de calibração. Após análise de regressão linear, foram determinadas as equações da reta utilizadas para determinação da concentração de proteínas totais no homogenato hepático, essas concentrações foram expressas em mg/mL.

### **5.11 Determinação de gordura no fígado.**

A extração de gorduras no fígado foi realizada segundo Folch, Lees e Sloane-Stanley (1957).

Foi utilizado 400 mg do tecido hepático diluído em 8 mL de solução de clorofórmio-metanol (2:1). O material foi vertido em tubos de vidro, previamente lavados com éter de petróleo. Em seguida, centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo previamente pesado e identificado. Em seguida foi acrescentado 2 mL da solução de NaCl 0,73% e centrifugado novamente, desprezando a fase superior. A parede do tubo foi lavada com 3 mL da solução de Folch - clorofórmio: metanol: água (3:48:47), desprezando a fase superior e, posteriormente, os tubos foram colocados em estufa semiaberta a 40°C para a evaporação dos solventes. Após a evaporação, os tubos foram colocados no dessecador para esfriar e foram pesados novamente. A quantidade de gordura do fígado foi obtida pela diferença entre a massa final (g) do tubo pelo peso inicial (g).

### **5.12 Determinação de gordura nas fezes**

A determinação da gordura extraída das fezes foi realizada de acordo com a metodologia de Folch, Lees e Sloane-Stanley (1957).

Inicialmente, 100 mg de fezes foram maceradas com 1 mL de solução de clorofórmio-metanol (2:1). O material foi vertido em tubos de vidro, previamente lavados com éter de petróleo. Foram adicionados 0,2 mL de metanol puro. Em seguida, centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo previamente pesado e identificado. Acrescentado 0,4 mL de clorofórmio puro, seguido de 0,32 mL de NaCl 0,73% e o material foi centrifugado novamente, e a fase superior foi desprezada. As paredes dos tubos foram lavadas com 0,5 mL da

solução de Folch - clorofórmio: metanol: água: NaCl 0,2% (3: 48: 47:2). Desprezou-se a fase superior e os tubos foram colocados em estufa semiaberta a 37°C para a evaporação dos solventes. Após a evaporação, os tubos foram resfriados no dessecador e pesados novamente. Os lipídios foram quantificados pela diferença de peso entre o tubo contendo os lipídios e o mesmo tubo vazio, previamente pesado.

### **5.13 Análises estatísticas**

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Kolmogorov–Smirnov. Posteriormente dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância univariada ANOVA *one-way* seguida pelo teste de *Tukey* e os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn e expressos como média  $\pm$  erro padrão ou mediana e intervalo interquartil, respectivamente. O grau de correlação linear entre duas variáveis foi determinado através da análise de Correlação de Pearson. Diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$ . Para realização das análises foi utilizado o *software GraphPad Prisma* versão 5.00 compatível com o sistema operacional *Windows* (San Diego, Califórnia, USA).



## 6 RESULTADOS

A composição centesimal das quatro farinhas foi determinada e os resultados encontrados estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3** - Composição centesimal em 100g de farinha de feijões

<b>Parâmetro</b>	<b>Farinha de Feijão Azuki</b>	<b>Farinha de Feijão Carioca</b>	<b>Farinha de Feijão Preto</b>	<b>Farinha de Feijão Vermelho</b>
<b>Umidade</b>	11,51 ± 0,40	10,53 ± 0,52	9,35 ± 0,50	10,12 ± 0,51
<b>Resíduo mineral fixo</b>	3,04 ± 0,002	3,49 ± 0,005	3,47 ± 0,006	2,57 ± 0,15
<b>Lipídios</b>	0,81 ± 0,53	1,99 ± 1,26	2,20 ± 0,03	3,43 ± 1,95
<b>Proteínas *</b>	19,6 ± 0,10	22,53 ± 0,10	20,52 ± 0,15	23,94 ± 0,08
<b>Carboidratos **</b>	65,04 ± 0,00	61,46 ± 0,00	64,46 ± 0,00	59,94 ± 0,00

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

\* Fator de conversão do nitrogênio em proteína: 6,25

\*\* Carboidratos = 100 - (umidade + proteínas + lipídios + cinzas)

Os resultados obtidos para o conteúdo de polifenóis totais, flavonoides são apresentados na tabela 4.

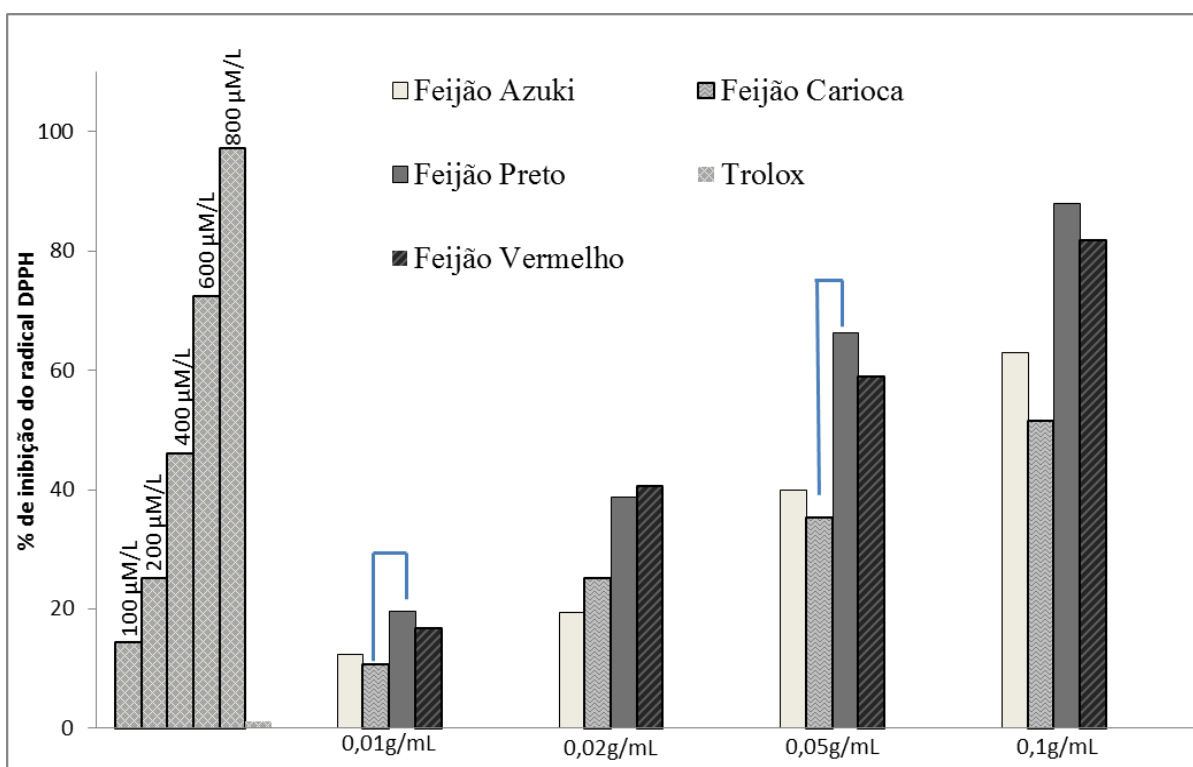
**Tabela 4.** Composição fitoquímica das farinhas de feijões.

	<b>Farinha de Feijão Azuki</b>	<b>Farinha de Feijão Carioca</b>	<b>Farinha de Feijão Preto</b>	<b>Farinha de Feijão Vermelho</b>
<b>Polifenóis totais mg/100g</b>	18,43 ± 0,31	19,86 ± 0,23	32,81 ± 0,23	40,52 ± 0,29
<b>Flavonoides totais mg/100g</b>	1,51 ± 0,28	5,67 ± 0,21	7,12 ± 0,11	5,86 ± 0,25

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os resultados da capacidade antioxidante foram expressos em percentual de inibição do radical DPPH. A partir desses valores pode-se perceber que todos os feijões se apresentam como uma importante fonte de antioxidantes.

Para essa análise, utilizaram-se três diferentes concentrações da farinha de feijão e do antioxidante de referência Trolox. A Figura 3 mostra que as farinhas dos feijões apresentaram alta capacidade de neutralização do radical DPPH, semelhante ao antioxidante padrão Trolox, na faixa de 100 a 800  $\mu\text{M}$  após 30 minutos, de maneira dose-dependente.



**Figura 3** - Percentual de inibição do radical DPPH, em diferentes concentrações das farinhas de feijões e do antioxidante padrão Trolox, após 30 minutos.

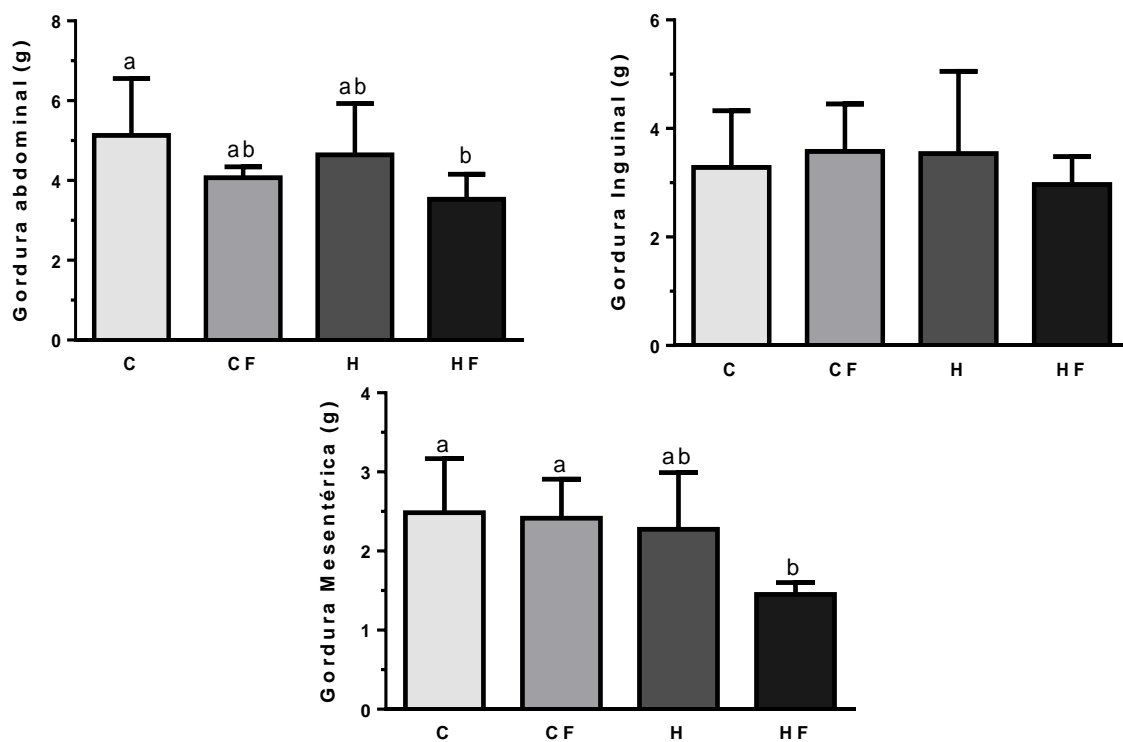
Ao observar a composição corporal dos animais, não houve diferença entre peso inicial e peso final dos ratos. Já em relação ao ganho de peso, o grupo que recebeu dieta hiperlipídica apresentou aumento de 7% (Tabela 5).

**Tabela 5.** Composição corporal, ingestão alimentar e excreção fecal em ratos que receberam dieta controle e hiperlipídica tratados com Farinha de feijão vermelho.

Variáveis	Grupos experimentais			
	C	CF	H	HF
<b>Peso Inicial (g)</b>	138,9 ± 10,21	139,7 ± 9,78	138,5 ± 12,37	135,5 ± 8,60
<b>Ingestão (g/dia)</b>	11,18 ± 1,25 <sup>a</sup>	11,08 ± 0,79 <sup>a</sup>	8,72 ± 0,37 <sup>b</sup>	9,10 ± 0,20 <sup>ab</sup>
<b>Ganho de peso (g)</b>	60,33 ± 7,52 <sup>b</sup>	67,11 ± 11,60 <sup>ab</sup>	80,63 ± 14,72 <sup>a</sup>	66,55 ± 5,65 <sup>ab</sup>
<b>Peso Final (g)</b>	204,2 ± 9,15	205,7 ± 13,73	219,1 ± 23,43	201,0 ± 12,01
<b>Excreção fecal (g/dia)</b>	0,6514 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,166 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,7060 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,6862 ± 0,05 <sup>b</sup>
<b>Lipídios fecais (mg/g de fezes diárias)</b>	31,47 ± 7,6 <sup>a</sup>	38,04 ± 13,7 <sup>a</sup>	74,31 ± 14,5 <sup>b</sup>	79,91 ± 15,2 <sup>b</sup>

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n=8). Letras sobrescritas diferentes em uma mesma linha indicam diferenças estatísticas (P <0,05).

Em relação ao peso das gorduras (Fig 4), a abdominal e a mesentérica apresentaram uma redução no grupo HF, mostrando que o feijão tem efeito na redução dessas medidas. A Inguinal não teve diferença entre os grupos.

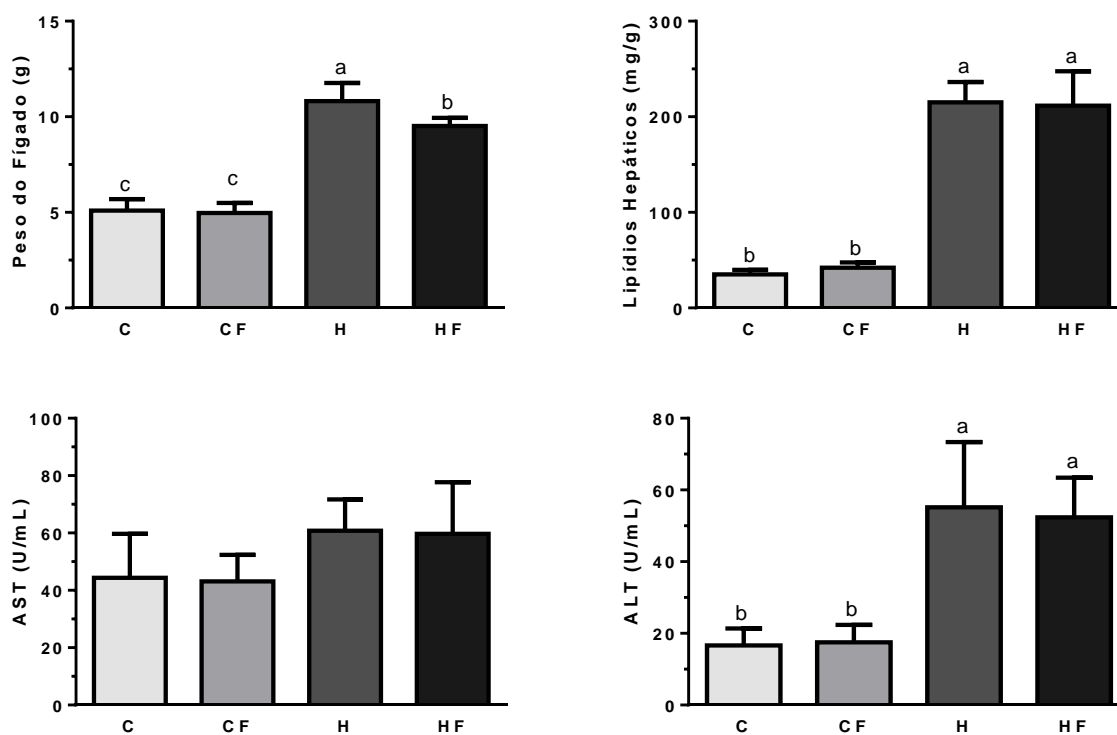


**Figura 4** – Peso das gorduras corporais. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Os dados foram analisados por ANOVA One-way; Interações foram significativas quando ( $P < 0,05$ ).

\*Dados submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; valores diferentes são marcados com letras diferentes sobrescritas ( $P < 0,05$ ).

Os grupos que receberam dieta hiperlipídica apresentaram um maior peso do fígado e conseqüentemente maior concentração de lipídios hepáticos, em relação aos animais que receberam dieta controle. Entretanto, houve redução do peso do fígado no grupo HF em relação ao grupo H. Isso mostra que a adição do feijão à dieta com alto teor de gorduras pode trazer algum benefício ao órgão, gerado pelo acúmulo de gorduras. ALT se apresentou mais elevada nos grupos que consumiram dieta hiperlipídica e AST foi igual para todos os grupos, como mostrado na figura 05. Esse resultado pode ser explicado pelo fato da primeira ser uma enzima apenas citosólica e a segunda ser citosólica e mitocondrial.

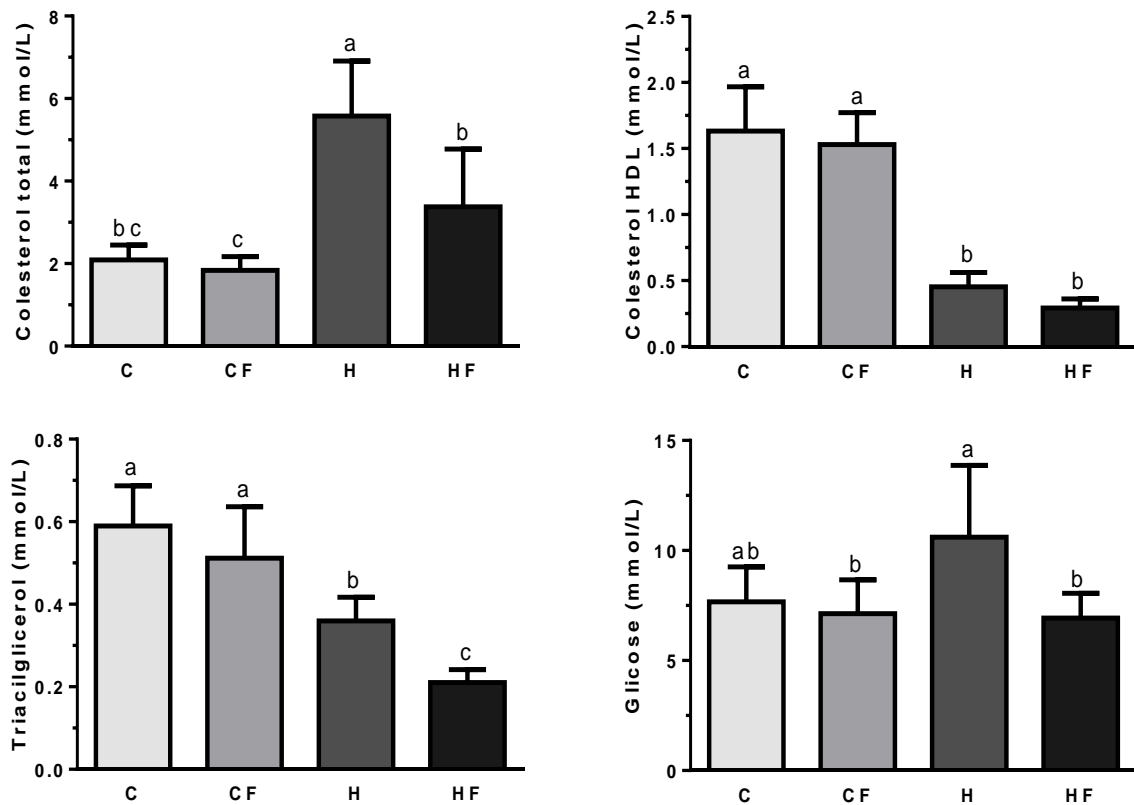


**Figura 5** - Lipídios hepáticos e atividade da AST (Aspartato aminotransferase), ALT (Alanina aminostransferase). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Os dados foram analisados por ANOVA One-way; Interações foram significativas quando ( $P < 0,05$ ).

\*Dados submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; valores diferentes são marcados com letras diferentes sobrescritas ( $P < 0,05$ ).

Para avaliar o perfil lipídico dos animais foram dosados os níveis séricos de colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis, mostrando que o grupo HF apresentou redução do CT e TG quando comparado aos animais que receberam a mesma dieta, porém sem o acréscimo de feijão (**Fig. 06**). Em relação ao HDL, o grupo que consumiu dieta com elevado teor lipídico, apresentou uma redução de 3,6x em relação ao grupo controle. Foi realizada também a dosagem de glicose, que apresentou uma redução no grupo HF quando comparado ao grupo H



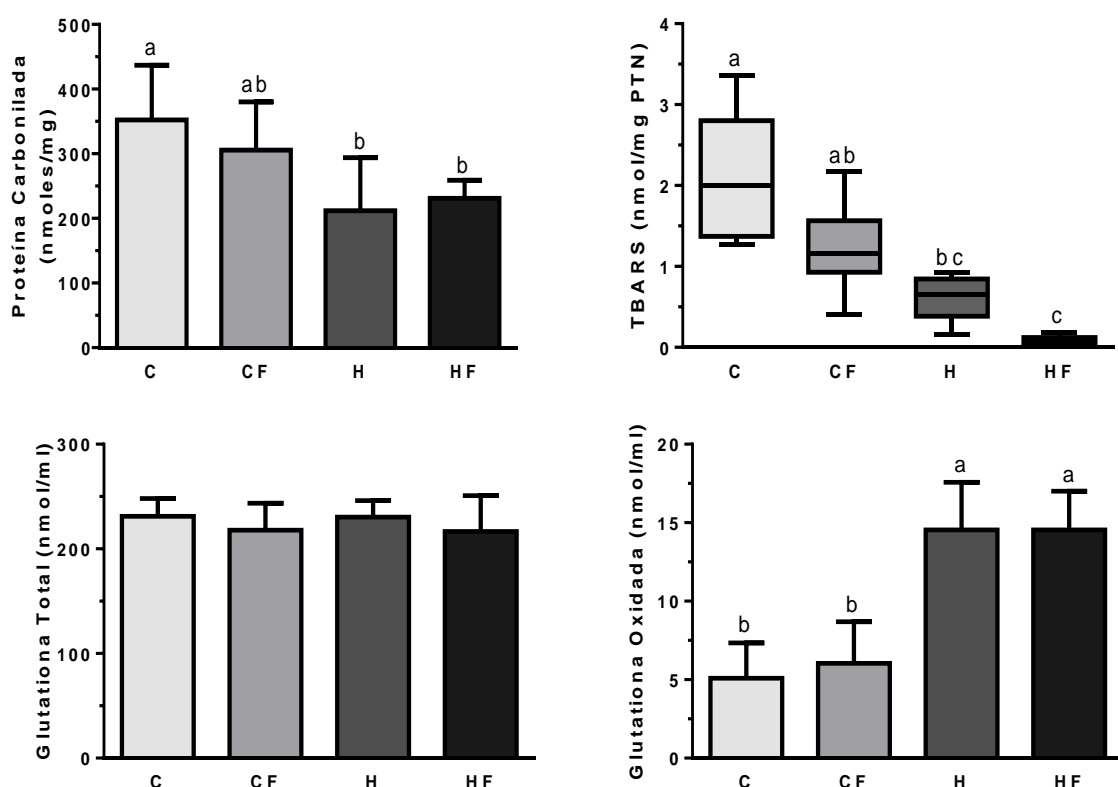
**Figura 6** - Marcadores bioquímicos no Soro. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Os dados foram analisados por ANOVA One-way; Interações foram significativas quando ( $P < 0,05$ ). \*Dados submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; valores diferentes são marcados com letras diferentes sobrescritas ( $P < 0,05$ ).

Como marcadores do estresse oxidativo, foram avaliados os níveis de proteína carbonilada e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

A concentração de proteína carbonilada foi influenciada pela dieta, os grupos que receberam dieta hiperlipídica tiveram menores níveis desses marcadores. Na concentração de TBARS, o grupo H também apresentou menor concentração comparada ao grupo C e houve tendência de redução de TBARS para os grupos CF e HF comparados aos seus respectivos controles.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para a concentração total de glutathione (oxidada + reduzida), mas para a concentração de glutathione oxidada, foi observada diferença entre os grupos, a maior concentração presente nos grupos que consumiram dieta hiperlipídica indica a ocorrência de maior estresse nos mesmos, entretanto nenhuma alteração foi observada pela adição de feijão às dietas.



**Figura 7** - Biomarcadores do estresse oxidativo e concentrações de glutathione total e oxidada. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram analisados por ANOVA One-way; Interações foram significativas quando ( $P < 0,05$ ). \*Dados submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; valores diferentes são marcados com letras diferentes sobrescritas ( $P < 0,05$ ).

Em relação às defesas antioxidantes, a Superóxido dismutase teve maior atividade nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica, quando comparados ao grupo controle, já a atividade da catalase foi a mesma em todos os grupos. As glutatonas redutase, peroxidase e S-transferase se comportaram de maneira similar, mostrando um efeito causado pela dieta, e apenas na S-transferase esse efeito foi intensificado pela adição de feijão à dieta.

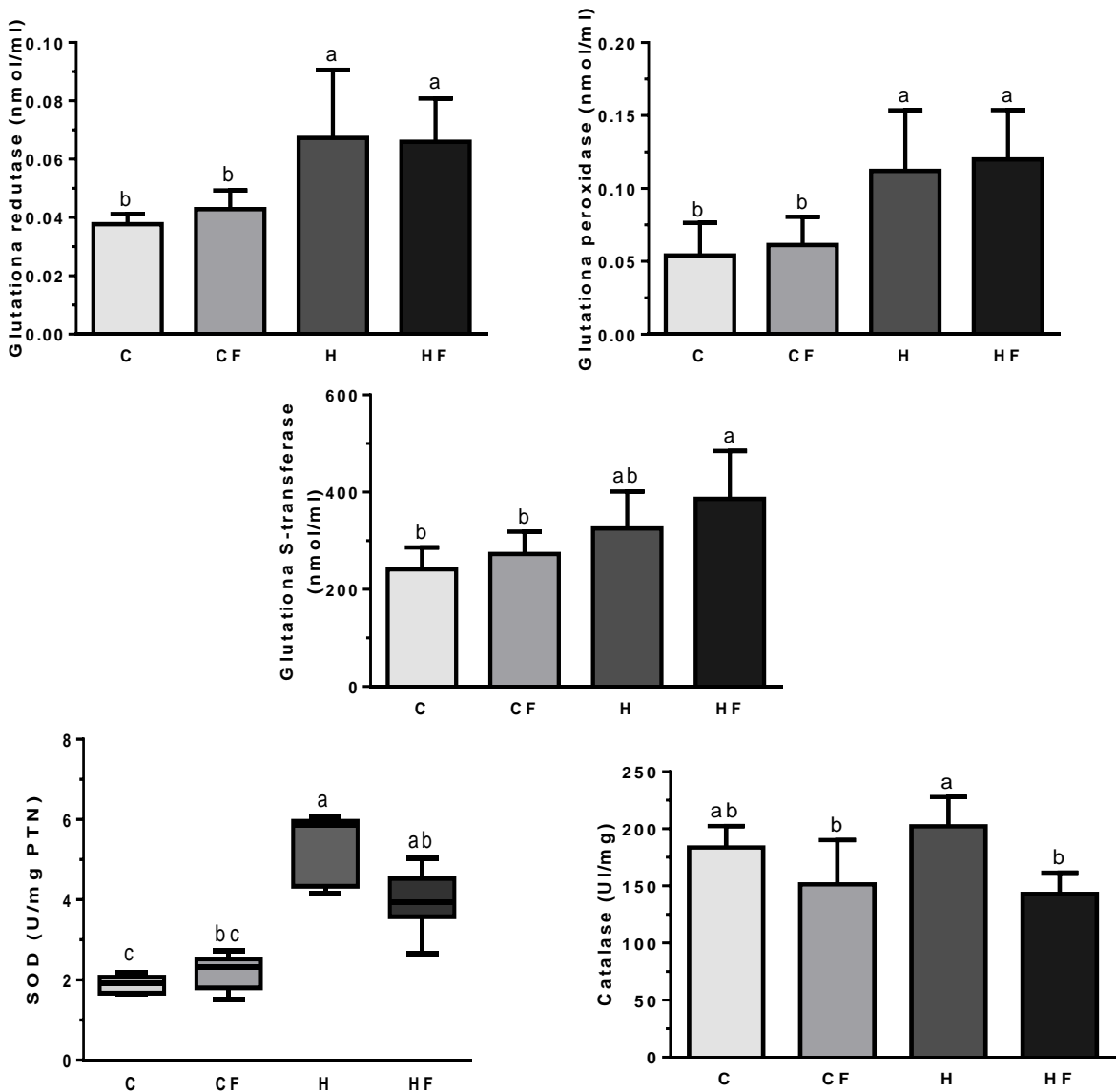


Figura 8 - Defesas antioxidantes. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão.



Os dados foram analisados por ANOVA One-way; Interações foram significativas quando ( $P < 0,05$ ). \*Dados submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; valores diferentes são marcados com letras diferentes sobrescritas ( $P < 0,05$ ).

## 7 DISCUSSÃO

Como elemento fundamental para ações de orientação nutricional está o conhecimento da diversidade e da composição dos diferentes alimentos consumidos nas diferentes regiões do Brasil (TACO, 2006). O presente estudo apresenta os potenciais benefícios do feijão sobre as alterações de metabólitos séricos e de danos oxidativos hepáticos desencadeados por dieta hiperlipídica.

Para a escolha da quantidade da leguminosa a ser oferecida, foi utilizado o guia alimentar para a população Brasileira (2005), ele estabelece que deve ser orientado e estimulado o consumo de leguminosas diariamente, esse consumo deve ser de pelo menos 1 porção e representar no mínimo 5% da energia diária, considerando que habitualmente o brasileiro consome feijão em duas refeições (almoço e jantar) utilizamos 10% dessa leguminosa, no experimento in vivo.

A composição fitoquímica do feijão diz muito sobre a qualidade final do produto. Na literatura existem estudos que utilizam esse alimento na forma crua (BURATTO, 2017; PADERMO 2017; LOVATO, 2018), porém o trabalho se deu com amostras após maceração e cozimento, uma vez que a informação obtida após esse processamento é mais relevante, já que o feijão é um alimento usualmente cozido.

Os compostos fenólicos presentes nos feijões são conhecidos como importantes fitonutrientes capazes de reduzir o risco de diversas patologias (RAMARATHNAM *et al.*, 1995). Segundo BENINGER E HOSFIELD (2003), essa característica é devida à capacidade antioxidante concedida por esses compostos.

Na literatura, são apresentados diferentes valores de polifenóis totais, para diferentes cultivares de feijão. Estudos mostram variação de 1,17 a 36mg/100g (LUTHRIA e PASTOR-CORRALES, 2006). No presente estudo, os valores de polifenóis foram bem próximos aos resultados que são descritos na literatura, apenas o feijão preto ficou acima do relatado por Luthria e Pastor-Corrales (2006). Em relação aos flavonoides, Boateng *et al.*, (2008) relatou que eles variam de 0,24 a 0,84mg/100g nossas análises mostraram valores superiores para todos os feijões estudados, essa diferença pode ser explicada porque a concentração no trabalho de Boateng *et al* (2008) foi expressa em equivalente de catequina, enquanto no presente estudo os dados foram expressos como equivalentes de quercetina.

As diferenças encontradas por diferentes autores foram discutidas por Ninfali e Bacchiocca (2003). Estes autores consideram que possíveis motivos para a diferença de valores, se devem, entre outras coisas, ao genótipo (cultivar ou variedade), às condições climáticas, forma de cultivo, maturação na hora da colheita e armazenamento. Em acordo com esta consideração, Barampama e Simard (1993) demonstraram essa variação quando estudaram quatro variedades de feijão cultivadas em quatro regiões diferentes e constataram que variedades idênticas têm valores diferentes na composição química.

Os resultados mostraram que o feijão preto se destacou em relação ao carioca, tanto para a capacidade antioxidante, quanto para o teor de polifenóis. Esses resultados confirmam os achados de Heimler (2005) e Pellegrini *et al.*, 2006, eles encontraram que o teor de polifenóis no feijão está relacionado com a cor da casca, estando presentes em maiores concentrações nas sementes coloridas.

A partir dos resultados, indicando o feijão como uma importante fonte de polifenóis e capacidade antioxidante, foi avaliado se o perfil resulta em efeito *in vivo*, já que a avaliação *in vitro* não considera alguns fatores importantes. Como abordado por Huang *et al.*, 2005, o estudo *in vitro* não leva em conta a biodisponibilidade destes compostos, seu metabolismo, a retenção destes pelos tecidos e a atividade celular

Quanto à ingestão, os resultados obtidos corroboram com os resultados observados por Lopes (2014), onde os grupos que receberam a dieta rica em gordura ingeriram menos do que o grupo controle. Já Turbino-Ribeiro *et al.* (2003) encontraram um maior consumo de dieta hiperlipídica quando comparada ao controle e ainda Souza *et al.* (2010), observou que não há diferença no consumo entre o grupo controle e hiperlipídico. Essa variação é comum em ratos, pois eles conseguem fazer uma regulação da ingestão alimentar de acordo com a necessidade energética.

As dietas hiperlipídicas são mais energéticas quando comparadas a dieta controle, isso pode explicar o fato dos ratos do grupo H apresentarem um consumo menor e mesmo assim não apresentarem diferença no peso final em relação aos outros grupos. O menor consumo grupo H demonstrado nesse trabalho, também foi encontrado por Viana (2015) e Lopes (2014).

As diferenças de resultados apresentadas nos estudos, para o ganho de peso, ingestão alimentar e excreção fecal podem ser devidos ao fato de terem diferença nas

dietas utilizadas, idade dos animais no início do tratamento, tempo de duração do experimento.

A concentração de colesterol sofreu uma elevação no grupo H que recebeu dieta acrescida desse composto, enquanto o grupo HF apresentou concentração de colesterol similar ao controle, indicando que o feijão foi eficiente na redução desse componente. Resultado também encontrado por Finley (2007), ele relatou que indivíduos saudáveis ou com pré-disposição à síndrome metabólica possuem uma redução dos níveis de colesterol total, quando fazem ingestão diária dessa leguminosa.

O mecanismo pelo qual o feijão leva a redução do colesterol não está totalmente elucidado, mas as hipóteses sugerem que essa redução não ocorre apenas devido a um fator e sim pela ação de vários componentes presentes nessa leguminosa, dentre os componentes mais aceitos para propiciar essa redução estão: proteínas, fibra solúvel, saponinas, esteroides, polifenóis e fitatos.

Há relatos de que a ingestão de proteína vegetal leva à redução dos níveis de colesterol, quando comparada a ingestão de proteína animal, GILANI et al. (2002) encontrou diminuição dos níveis de colesterol plasmático quando ocorria o consumo de proteína vegetal. Alguns estudos sugerem que esse efeito é devido à composição aminoacídica e no equilíbrio entre aminoácidos essenciais e não essenciais de dessas proteínas (SHUTLER, 1987) e ainda outros mostram que a ingestão desse tipo de proteína leva ao aumento da excreção fecal de esteróides, pois diminuí a sua absorção no intestino (BELLEVILLE, 2002).

A fibra alimentar é sugerida como importante componente de diminuição do colesterol. A fibra solúvel absorve água no intestino, formando uma solução viscosa que é responsável por absorver sais biliares e eliminá-los, gerando alterações no metabolismo do colesterol (THARANATHAN, 2003), dessa forma o consumo de fibra força o deslocamento do colesterol do soro e de armazenamento, para que sejam produzidos mais ácidos biliares (SARTORELLI e CARDOSO, 2006). Além disso, as fibras solúveis formam ácidos graxos de cadeia curta quando são fermentados no cólon. Esses Ácidos graxos são absorvidos e causam alteração na síntese de colesterol no fígado.

Outra substância presente no feijão e que já foi descrita em artigos como responsável por diminuição do colesterol é a saponina. Na presença de saponinas, ocorre um aumento da adsorção de ácidos biliares à fibra alimentar. Isso gera a

formação de micelas de grande peso molecular impedindo a reabsorção desses ácidos, levando a uma maior conversão hepática de colesterol para ácidos biliares (MILGATE, 1995).

Os fitoesteróis também são componentes apontados como redutores do colesterol, pois tem estrutura muito similar à do colesterol, assim competem pelo sítio de absorção da mucosa intestinal. O consumo de alimentos contendo polifenóis também é apontado como responsável pela diminuição do colesterol sérico, isso se deve ao fato das isoflavonas, pertencentes a classe dos flavonoides, terem estrutura similar a hormônios esteroides e assim realizar função semelhante a do estrogênio. Quando ocorre a ingestão desse hormônio em ratos, há uma indução dos receptores de lipoproteínas hepáticas, levando a maior remoção do VLDL e LDL do plasma. Por ter a estrutura muito similar, é provável que as isoflavonas tenham esse papel, levando a diminuição dos lipídios séricos (PEIXOTO, 2011).

O grupo H apresentou uma redução dos níveis de TG e uma redução maior ainda foi observada no grupo HF. Essa redução nos grupos H e HF podem ser explicadas pela ingestão de dieta com alto teor lipídico, os ácidos graxos insaturados contidos nessa alimentação são responsáveis pela inibição de enzimas ligadas ao metabolismo das lipoproteínas, fazendo com que ocorra uma redução dos níveis de TG circulantes (CONNOR, DEFRANCESCO e CONNOR, 1993). Quanto à maior diminuição observada no grupo HF tem-se sugerido que possa ser pela ação dos flavonoides. LIMA et al., (1999) sugeriram que os flavonoides possam aumentar a atividade das lipases, gerando uma maior hidrólise dos TG e conseqüentemente, diminuição dos níveis circulantes desses compostos

Outros autores observaram resultados semelhantes ao presente estudo, Paula *et al.* (2009), Souza *et al.* (2010) encontraram um aumento do CT e do colesterol não-HDL e diminuição do colesterol-HDL e de TG em ratos alimentados com dieta hiperlipídica.

O feijão é fonte de amido resistente. Amido resistente (RS) é a porção de amido que não é digerida no intestino delgado de indivíduos saudáveis, mas é fermentada no intestino grosso. Uma das características químicas do amido resistente é o teor elevado de amilose e estrutura específica da molécula de amilopectina. Fisiologicamente semelhante às fibras alimentares, aumenta o volume fecal, reduz o pH do cólon, reduz o colesterol sérico e os níveis de triglicérides (SINGH, 2017). Além disso, embora ainda

em fase inicial, estudos apontam o amido resistente como um alimento probiótico - altera a microbiota intestinal e desencadeia vias de sinalização celular associadas a efeitos antiinflamatórios, antidiabéticos e anti-obesidade (YANG, 2017).

Esses efeitos podem explicar o fato dos animais que consumiram a dieta acrescida de 10% de feijão apresentarem redução nos níveis de glicose sanguínea. Esse episódio também pode ser explicado pelo fato dos feijões possuírem substâncias, como a faseolamina, que inibem a alfa amilase, enzima envolvida no processo de conversão do amido em glicose, levando a um aumento da glicemia. Em um estudo realizado por Pari e Venkateswarn (2003; 2004) mostrou que a ingestão de extrato de feijão (*Phaseolus Vulgaris*) foi responsável pela redução da glicemia, tanto em animais diabéticos quanto nos saudáveis.

O estresse oxidativo representa uma situação onde existe um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e a disponibilidade da atividade dos antioxidantes. Este equilíbrio é perturbado pelo aumento da geração de radicais livres ou diminuição da atividade antioxidante (BARBOSA et al., 2010). Para avaliar se a ingestão de feijão afeta o equilíbrio oxidante-antioxidante, foi determinado a concentração de marcadores de danos oxidativos: TBARS, proteína carbonilada, e glutatona oxidada e de enzimas antioxidantes.

Os biomarcadores são ferramentas úteis para avaliar estresse *in vivo*, porque os radicais livres têm meia-vida muito curta (da ordem de alguns segundos) e sua medição *in vivo* apresenta muitos desafios. No entanto, derivados radicais oxí e hidroperóxidos lipídicos são estáveis e têm meia-vida longa (horas a semanas) e assim, podem ser medidos e monitorados (CZERSKA, 2015). No presente trabalhos derivados da peroxidação lipídica foram determinados por sua capacidade de reagirem com o ácido tiobarbitúrico.

As proteínas carboniladas são formadas através de clivagem oxidativa de esqueletos de proteínas. A desaminação oxidativa da lisina e do ácido glutâmico também resulta em proteínas carboniladas. Como as carbonilas podem surgir de diferentes mecanismos, sua concentração é comumente maior do que a de outros biomarcadores. Os grupos carbonílicos podem também ser introduzidos por ligação de produtos de oxidação de lipídios aldeídicos aos resíduos de lisina, cisteína e histidina, resultando em produtos finais de lipoxidação avançados (FRIJHOFF, 2015).

O tripeptídeo glutationa (GSH) é o principal tiol não proteico. Como as concentrações intracelulares de GSH são altas, na faixa milimolar, é um componente importante dos sistemas de defesa antioxidante, o que leva à glutationa oxidada (GSSG). A oxidação de GSH é reversível à medida que glutationa redutase e NADPH reduzem GSSG de volta a duas moléculas de GSH. Em geral, qualquer condição associada a excesso de ROS irá diminuir os níveis de GSH ou diminuir a relação GSH / GSSG (FRIJHOFF, 2015).

A catalase processa enzimaticamente o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, desempenhando, por isso, um importante papel contra as complicações geradas pelo estresse oxidativo, como diabetes e doenças cardiovasculares. O aumento do risco de diabetes foi documentado em pacientes com deficiência de catalase e a deficiência dessa enzima leva, na célula  $\beta$ , a um aumento no estresse oxidativo e, finalmente, a uma falha desse tipo de célula (TIWARI, 2013).

Para completar o sistema antioxidante enzimático, juntamente com a catalase, glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR), encontra-se a Superóxido dismutase. Existem formas principais de SOD. Uma delas é a CuZnSOD (SOD1), que existe principalmente no citoplasma, estando o cobre e o zinco presentes no sítio ativo. A outra é a MnSOD (SOD2), localizada na matriz mitocondrial, estando o manganês presente no sítio ativo. Eles podem catalisar a reação para decompor os radicais ânion superóxido em  $H_2O_2$ , que será então convertido em água e oxigênio por CAT ou GPx (PENG, 2014)

Observando o efeito da dieta hiperlipídica para os marcadores de danos oxidativos, percebem-se que os grupos que consumiram dieta hiperlipídica (Grupo H e HF) apresentaram um menor dano, quando comparado aos grupos C e CF. Esse achado é, a princípio, contraditório. A literatura tem relatado que o acúmulo de lipídios no hepatócito prejudica a capacidade oxidativa das mitocôndrias, aumentando o estado reduzido dos complexos da cadeia de transporte de elétrons (ETC) e estimulando as vias peroxissomal e microssomal da oxidação de gordura. O conseqüente aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e derivados aldeídicos reativos causa estresse oxidativo (ROLO, 2012). Embora ainda a ser confirmado, a hipótese levantada é que o óleo de soja, que representa 25% da dieta oferecida aos animais dos grupos H e HP, continha vitamina E e outros antioxidantes sintéticos, um importante nutriente antioxidante. Um estudo realizado por Zamin Jr (2010) mostrou que animais que

consomem vitamina E possuem reduções significativas no estresse oxidativo concomitante a uma preservação da glutatona desses animais.

Esses fatos tornam o presente trabalho limitado com relação aos possíveis efeitos do feijão sobre danos oxidativos. Entretanto, ainda assim, alguns efeitos foram sinalizados: houve tendência de redução de TBARS para os grupos CF e HF comparados aos seus respectivos controles, e redução das enzimas antioxidantes SOD e catalase no grupo HF comparado ao grupo H.

A glutatona redutase e peroxidase se encontram elevadas nos grupos H e HF, indicando que essas enzimas apresentam maior atividade para reequilibrar o estresse oxidativo gerado pela dieta hiperlipídica, o que também pode explicar a redução dos valores encontrados para TBARS e proteínas carboniladas nesses grupos.

Ao inativar um agente oxidante, a GSH é convertida em GSSG. Em situações normais, haverá a recuperação da GSH. Porém quando ocorre presença de agentes oxidantes em excesso, ou há alguma falha do sistema protetor, vai gerar um aumento de GSSG. Dessa forma, a razão entre GSSG e GSH pode prever a intensidade do estresse oxidativo (HALLIWEL, 1993). Por esse marcador, pode-se sugerir que, no grupo H, o sistema antioxidante atuou de forma a evitar o estresse oxidativo.

A SOD catalisa a dismutação do radical Superóxido em peróxido de hidrogênio, e a catalase vai agir em seguida, convertendo-o em água e oxigênio molecular (TROMM, 2011). Os resultados mostraram que a SOD e a catalase tiveram uma diminuição no grupo HF, sugerindo que essas duas enzimas foram menos acionadas possivelmente por ter componentes do feijão contribuído com as defesas antioxidantes, pois se sabe que as expressões e as atividades dessas enzimas são aumentadas em situação de maior estresse oxidativo. Algumas enzimas antioxidantes são controladas pela mesma via de transcrição de três componentes: o elemento de resposta antioxidante (ARE), o fator nuclear fator 2 relacionado ao eritrócito 2 (Nrf2) e a proteína 1 associada à ECH tipo Kelch (Keap1 4, 7). Estudos indicaram aumento na produção de EROs, ativa essa via, que por sua vez, desencadeia a expressão da enzima antioxidantes (SURH, 2008) ocasionando maior atividade.

## 8 CONCLUSÃO:

Pelo presente estudo pode-se confirmar a presença de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante “in vitro” dos feijões Adzuki, Cariquinha, Preto e Vermelho, encontrados no comércio da cidade de Ouro Preto.

Os resultados do estudo *in vivo* mostraram que a adição da farinha de feijão vermelho à dieta hiperlipídica não afeta o consumo da dieta e a massa corporal, mas foi capaz de reduzir a massa de tecidos adiposos, a glicemia e o colesterol sérico; além disso, indicou um efeito antioxidante *in vivo*.

Em conjunto os resultados confirmam efeitos benéficos dessa leguminosa, fortalecem a ideia que seu consumo deve ser estimulado e abre perspectivas para estudos posteriores.



## 9 REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, v.105, p. 121-6, 1984.
- ACCIOLY, Marilita Falângola et al. Efeito do exercício físico e estatinas na função muscular em animais com dislipidemia. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*. 2012.
- ADEBOWALE, Y. A. Isolation, fractionation, and characterisation of proteins from mucuna bean. *Food Chemistry*, 2007.
- AGUIAR RS, MANINI R. A fisiologia da obesidade: bases genéticas, ambientais e sua relação com o diabetes. *ComCiência*. 2013; (145): 0-0.
- ANDERSON, J. W. Health benefits of dietary fiber. *Nutrition reviews*, 2009.
- ANGELO, P.M., JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.66, n.1, p.1-9, 2007
- ANTUNES, P. L.; BILHALVA, A. B.; ELIAS, M. C.; SOARES, G. J. D. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivares rico 23, carioca, pirata-1 e rosinha-G2. *Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas*, v. 1, n. 1, p. 12-18, jan./ abr. 1995
- AUGUSTIN, J., BECK, C. B., KALBFLEISH, G., KAGEL, L. C. AND MATTHEWS, R. H. Variation in the vitamin and mineral content of raw and cooked commercial *Phaseolus vulgaris* classes. *J. Food Sci.* 46:1701–1706, 2000.
- BARAMPAMA, Z.; SIMARD, R.E., 1993. Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in Burundi. *Food Chemistry*, 47, 159-167.
- BELLEVILLE, J. Hypocholesterolemic effect of soy protein. *Nutrition*. 18(7/8): 684-685, 2002
- BENCHIMOL KB, CARDOSO IS. Esteato-hepatite não-alcoólica induzida por rápida perda de peso em uso de balão intragástrico: relato de caso. *Arq Bras Endocrinol Metabol.*51:631-34, 2007.
- BENINGER, C. W. HOSFIELD, G. L. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 51:7879–7883, 2003.
- BLAIR M., GONZALES L.F., KIMANI P.M., BUTARE L. Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from central Africa. *Theor. Appl. Genet*, 121:237–248, 2010.

- BOATENG, J.; VERGHESE, M.; WALKER L.T.; OGUTU, S., 2008. Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus* spp. L.). *Food Science and Technology*, 41, 1541-1547.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v.28, p.25-30. 1995
- BRASIL. Guia alimentar para a população brasileira: Promovendo a alimentação saudável / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição – Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 236p.
- BRESSANI, R. et al. Evaluación de dos métodos para establecer el contenido de polifenoles en frijol crudo y cocido, y efecto que estos provocan en la digestibilidad de la proteína. *Arch. Latinoam. Nutr.*, Venezuela, v. XLI, n. 4, p. 570-583, 1991
- BROUGHTON, W.G. et al. Beans (*Phaseolus spp.*) – model food legumes. *Plant and Soil*, Hague, v.252, p.55-128, 2003.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 52, p. 302-310, 1978.
- BURATTO, J. S. MODA-CIRINO, V. Estimativas de parâmetros genéticos para ferro, zinco, magnésio e fósforo em grãos de feijão. *Comunicata Scientiae* 8 (1): 24-31, 2017
- CAMBRI, L. T. et al. Perfil lipídico, dislipidemias e exercícios físicos. *Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano*. 2006.
- CARDADOR-MARTÍNEZ, A., LOARCA-PINA, G. OOMAH, B. D. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50:6975–6980, 2002.
- CARNEIRO, J. C. S. et al. Perfil sensorial e aceitabilidade de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, vol.25, n.1, pp.18-24, 2005
- CARBONARO, M. et al. Perspectives into Factors Limiting in Vivo Digestion of Legume Proteins: Antinutritional Compounds or Storage Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry [S.I.]*, v. 48, n. 3, p. 742-749, 2000.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Doenças associadas à resistência à insulina/ hiperinsulinemia, não incluídas na síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, v.50, n.2, p. 360-367, 2006.
- CAO, G., SOFIC, E. PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biochem. Med.* 22:749–760, 1997.
- CAVE M, DEACIUC I, MENDEZ C, SONG Z, JOSHI-BARVE S, BARVE S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem.* 18:184–95, 2007.

CHAMP, P.C.HARVEY, R.A. Bioquímica ilustrada. 2 edição. Porto alegre: Artmed, 2000,446p.

CHANG, K. C., SATTERLEE, L.D. Isolation and charecterization of the major protein from Greath Northern beans (*Phaseolus vulgaris*). Journal of Food Science, 46(4):1368-1373, 1981

CHANNON, K.M.GUZIK, T.J. Mechanisms of superoxide production in human blood. Journal of Physiology and Pharmacology, 2002

CHÁVEZ-SANTOSCOY, R. A. et al., Effect of flavonoids and Saponins Extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris*) seed coats as cholesterol micelle disruptors. Plant foods for human nutrition, 2013.

CHIARADIA, A. C.; GOMES, J. C. Feijão: química, nutrição e tecnologia. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 1997.

Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quarto levantamento, janeiro. Brasília: CONAB, 2012.

COHN, J. S. et al. Reduction in intestinal cholesterol absorption by various food components: mechanism and implications. Atherosclerosis Suppements, 2010.

CONNOR, W. E.; DEFRANCESCO, C. A.; CONNOR, S. L. N-3 fatty acids from fish oil. Effects on plasma lipoproteins and hypertriglyceridemic patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 683, p. 16-34, 1993.

COOLING, J. BLUNDELL, J. Differences in energy expenditure and substrate oxidation between habitual high fat and low fat consumers (phenotypes). *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998.

COHEN, A. J. Estimates and 25-years trends of the global burden of disease attributable to ambiente air pollution: na analysis of data from the global burden of diseases study 2015. *The lancet* 389, 2017.

COSTA DE OLIVEIRA, A. et al. O processamento doméstico do feijão comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiase e verbascose. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 51, p. 276- 283, 2001.

CZERSKA M, MIKOŁAJEWSKA K, ZIELIŃSKI M, GROMADZIŃSKA J, WĄSOWICZ W. Today's oxidative stress markers. *Med Pr*. 2015;66(3):393–405.

CUNHA, A. P. ROQUE, O.R. Esteróis e triterpeno: ácidos biliares, precursores de vitamina D e fitoesteróis, cardiotônicos, hormonas esteróides, matérias-primas de núcleo esteróide usadas em sínteses parciais e saponósidos. *Farmacnosia e fitoquímica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.

DARZI, J. et al., Do SCFA have a role in appetite regulation? Proceedings of the Nutrition Society, 2011.

DAY CP, JAMES OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. Apr;114 (4):842-5, 1998.

DEL PINO, V. H.; LAJOLO, F. M. Efecto inhibitorio de los taninos del frijol carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre la digestibilidad de la faseolina por dos sistemas multienzimáticos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 49-53, 2003.

DE MEJIA, E. G., CASTANO-TOSTADO, E. LOARCA-PINA, G. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mut. Res.* 441:1–9, 1999.

DINELLI, G., BONETTI, A., MINELLI, M., MAROTTI, I., CATIZONE, P. MAZZANTI, A. Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. *Food Chem.* 99(1):105–114, 2006.

ELIZABETH, R. N., ANNETE, H., FRANCISCO, G. R., JAVIER, I. F., GRACIELA, Z. ALBERTO, G. J. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chem.* 103:521–527, 2007.

ENGELAND A, BJORGE T, SOGAARD AJ, TVERDAL A. Body mass index in adolescence in relation to total mortality: 32-year follow-up of 227.000 Norwegian boys and girls. *Am J Med.* 2003; 157: 517-23.

ENJOJI M.; YASUTAKE K.; KOHJIMA M; NAKAMUTA M. Nutrition and nonalcoholic fatty liver disease: the significance of cholesterol. *Int J Hepatol.* 2012.

EVERARD A, CANI PD. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27: 73–83, 2013.

FINLEY, J.W.; BURRELL, J.; REEVES, P.G. Pinto Bean Consumption Changes SCFA Profiles in Fecal Fermentations, Bacterial Populations of the Lower Bowel, and Lipid Profiles in Blood of Humans. *Journal of Nutrition*, 137, 2391-2398.2007.

FLEMMING, K. WOOLCOTT CG, ALLEN A. C. VEUGELERS P.J. K.UHLE S. The association between caesarean section and childhood obesity revisited: a cohort study. *Arch Dis Childhood*, 2013.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOAN-STANLEY, G. H. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* v. 226, p. 497-509, 1957.

FRANCA, E. ALVES, J. G. B. Dislipidemia entre crianças e adolescentes de Pernambuco. *Arq. Brasileiro de Cardiologia.* 2006.

FRANCIS, G. et al., The biological action of saponins in animal systems: a review. *British journal of nutrition*, 2002.

FRIJHOFF J. WINYARD PG. ZARKOVIC N. DAVIES S S. STOCKER R, CHENG D. KNIGHT A R. TAYLOR EL. OETTRICH J. RUSKOVSKA T. GASPAROVIC A. CUADRADO A. WEBER D. POULSEN HE. GRUNE T. SCHMIDT H H.H.W. GHEZZI P. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 23: 1144–1170, 2015

GAEMERS, IC, GROEN AK. Novos esclarecimentos sobre a patogênese da doença gordurosa não-alcóolica do fígado. *Current Opinion in Lipidology*. 2006;17:268-73.

GALVÃO R, PLAVNIK FL, RIBEIRO FF, AJZEN SA, CHRISTOFALO DMJ, KOHLMANN Jr. O. Efeitos de diferentes graus de sensibilidade a insulina na função endotelial de pacientes obesos. *Arq Bras Cardiol*. 2012; 98 (1): 45-51.

GEIL, P. B.; ANDERSON, J. W. Nutrition and health implications of dry beans: a review. . *J Am College Nutr [S.I.]*, v. 13, p. 549-558, 1994.

GENOVESE, M. I., LAJOLO, F. M. Atividade inibitoria de tripsina do feijão (*Phaseolus vulgaris L.*): Avaliação crítica dos métodos de determinação. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 51(4):386-394, 2001

GEORGE, S. et al. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 5, p. 1370-1373, 2005

GESTETNER, B. Et al., Soybean saponins. Fate of ingested soybean saponins and the physiological aspect of their hemolytic activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1968.

GILANI, G. S., RATNAYAKE, W. M. N., BROOKS, S. P. J., et al. Effects of dietary protein and fat on cholesterol and fat metabolism in rats. *Nutrition Research*. 22:297-311, 2002.

GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA.

GRELA, E. R. GUNTER, K. D. Fatty acid composition and tocoferol content of some legume seeds. *Animal Feed Sci. Technol*. 52:325–331, 1995.

GUZMÁN-MALDONADO, S. H. et al. Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture [S.I.]*, v. 80, n. 13, p. 1874-1881, 2000.

HAIZHAO S. et al., Dietary *Phaseolus vulgaris* extract alleviated diet-induced obesity, insulin resistance and hepatic steatosis and alters gut microbiota composition in mice. *Journal of Functional Foods*, 2016.

HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*, 23 (1):118-26. 1993.

- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA, 2015.
- HAN, K, et al. Resistant Starch fraction prepared from kintoki bean affects gene expression of genes associated with cholesterol metabolism in rats. *Experimental Biology and Medicine* 229, 2004.
- HEIMLER, D. et al. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.53, p.3053-3056, 2005.
- HOOVER, R. SOSULSKI, F. W. A comparative study of the effect of acetylation on starches of *Phaseolus vulgaris* biotypes. *Starch*. 37:397–403. 1985
- HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, S.M.M. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, Ganesville, v. 44, n. 3, p. 672 - 676, 2011.
- HUANG MT, OSAWA T, HO CT, ROSEN RT. Food Phytochemicals for Cancer Prevention. I. Fruits and Vegetables. Austin, TX: American Chemical Society, 1994.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. A química por trás de ensaios de capacidade antioxidante. *J Quim Agr Alim*. v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.
- HUGHES, J. S. et al. Effects of dietary fiber and tannins on protein utilization in dry beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Research International*, v. 29, n. 3-4, p. 331-338, 1996
- IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.
- JEON, S.M. et al, AMPK, regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress, *Nature*, 2012.
- JENKINS,A. L. The glycemic index: Looking back 25 years. *Cereal Foods World*. 52:50–53, 2007.
- JONES, A.D.; ACHARYA, Y.; GALWAY, L.P. Urbanicity Gradients are associated with the household-and individual-level double burden of malnutrition in Sub-Saharan Africa. *J. Nutr.* **2016**.
- KLOP, B. ELTE, J. W. F. CABEZAS, M. C. Dislipidemia in Obesity:mechanisms and potential targets. *Nutrients*, 2013.
- KUTOS, T. et al., Dietary fibre contente of dry and processed beans. *Food chemistry*, 2003

LAJOLO, F. M. et al. Qualidade Nutricional. In: ARAÚJO, R. S. et al (Ed.). Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba: Potafos. p. 71-99, 1996.

LEVINE, R.L. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, v. 233, p. 346-357, 1994.

LI H, HORTMANN M, DAIBER A, OELZE M, OSTAD MA, SCHWARZ PM, *et al.* Cyclooxygenase 2-Selective and Nonselective Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Induce Oxidative Stress by Up-Regulating Vascular NADPH Oxidases. *JPET*. 326(3):745-53, 2008.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T.T.; OLIVEIRA, M. G. A.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; GOMES, S. M.; SEIXAS FILHO, J. T. Determinação da atividade de lipase na presença de morina, naringenina, naringina e rutina. *Ciênc. agrotec.*, v. 23, n. 3, p. 626-631, 1999.

LOPES, J. M. M. Efeito da suplementação com suco de uvaia (*Eugenia uvalha* Cambess) no perfil lipídico e no estresse oxidativo de ratas hipercolesterolêmicas. Ouro Preto: Universidade de Ouro Preto, 2014. 89p. Dissertação de mestrado.

LOVATO, F. KOWALESKI, J. SILVA, S. Z. HELDT, L. F. S. Composição centesimal e conteúdo mineral de diferentes cultivares de feijão biorfortificado (*Phaseolus vulgaris L.*). *Braz. J. Food Technol.*, Campinas, v. 21, 2018.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, v.193, p.265-75, 1951.

LUTHRIA, D.L.; PASTOR-CORRALES, M.A. Phenolic acids profiles of beans commonly consumed in United States. *Bean Improvement Cooperative Annual Report*, 49, 6-7. 2006

MARTINEZ, D. B., IBÁÑEZ, G. V., RINCÓN, L. F. Acído fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52(3):219-231, 2002

MILGATE, J. ROBERTS, D. C. K. The nutritional & biological significance of saponins. *Nutrition research*, 1995.

MOSCA, P. C. OLIVEIRA, F. M. ZANARDO, F. C. ROSATTO, F. M. ALMEIDA, J. M. PEREIRA, E. M. S. TAVANO, O. L. Composição e aceitabilidade entre crianças de uma creche/escola de Uberaba-MG de bolo de chocolate adicionado de grãos de feijão cozidos. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.16, n.4, p.403-410, 2014.

NACZK, M. AMAROWICZ, R. SHAHIDI, F.  $\alpha$ -Galactosides of Sucrose in Foods: Composition, Flatulence Causing Effects, and Removal. *ANTINUTRIENTS AND PHYTOCHEMICALS IN FOOD*. Capítulo 8. Pag 127-150. 1997.

- NELSON, DL, COX, MM Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5ª. Ed. Artmed, Porto Alegre – RS, 2011
- PASKOS P, PALETAS K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia*; 13(1):9-19, 2009.
- NERGIZ, C. GOKGOZ, E. Effects of tradicional cooking methods on some antinutrients and in vivo protein digestibility of dry bean varieties (*Phaseolus vulgaris L.*) Grown in turkey. *International Journal of Food science & technology*, 2007.
- NINFALI, P. BACCHIOCCA, M. Polyphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 2003.
- OSBORN, T.C., BURROW, M., BLISS, F.A. Purification and characterization of arcelin seed protein from common beans. *Plant Physiology*, Lancosta, v.86, n.1, p.399, 1988.
- PADERMO, S. S. H. Influência do processamento e do processo digestivo in vitro na bioacessibilidade de compostos fenólicos do feijão comum. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2017. Dissertação de mestrado.
- PAREDES, M. BECERRA, V. TAY, J. Inorganic nutritional composition of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) genotypes race Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69, 486–495, 2009
- PARI, L.; VENKATESWARAN, S., 2004. Protective role of *Phaseolus vulgaris* on changes in the fatty acid composition in experimental diabetes. *Journal of Medicinal Food*, 7, 204-209. 2004.
- PAULA, H. et al. Effect of an aqueous extract of annatto (*Bixa orellana*) seeds on lipid profile and biochemical markers of renal and hepatic function in hypercholesterolemic rats. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v. 52, n. 6, p. 1373 – 1378, 2009.
- PEIXOTO, J. C. et al., Benefícios da soja no controle da obesidade. *Revista eletrônica novo enfoque*, 2011
- PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; SALVATORE, S.; DEL RIO, D.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 1030-1038. 2006
- PENG, C.; WANG, X.; CHEN, J.; JIAO, R.; WANG, L.; LI, Y.M.; ZUO, Y.; LIU, Y.; LEI, L.; MA, K.Y.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *Biomed. Res. Int.* 2014.
- PEREIRA, C. A. S., COSTA, N. M. B. Proteínas do feijão preto sem casca: digestibilidade em animais convencionais e isentos de germes (germ-free). *Revista de Nutrição*, Campinas, 15(1): 5-14, 2002



PEREIRA RR, DE ABREU ICME, GUERRA JF DA C, et al. Açai (Euterpe oleracea Mart.) Upregulates paraoxonase 1 expressão gênica e atividade com redução concomitante de esteatose hepática em ratas com alto teor de gordura alimentada. *Medicina Oxidativa e Longevidade Celular*. 2016.

PEYRIN-BIROULET L, BIGARD MA. Gaz digestifs. *Encycl Med Chir* 2005.

PIRES, C.V. et al., qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. *Ciência e Tecnologia dos alimentos*, Campinas, v.26, 2006

PUJOLA, M. et al., Protein and starch content of raw, soaked and cooked beans (*Phaseolus vulgaris*) *Food Chemistry*, 2007.

RAMARATHANAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to humans health. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 75-82. 1995

RAMIREZ-CÁRDENAS, L., A. J. LEONEL, ET AL. "Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum." *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas 28(1): 200-213, 2008.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H. & FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition and hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J.Nutr.*, v.123, p.1939-51, 1993

REN W, QIAN Z, WANG H, ZHU L, ZHANG L. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Res Rev* 23(4): 519–534, 2003.

REUTER CP, BURGOS MS, PRITSCH CV, SILVA PT, MARQUES KC, SOUZA S, et al. Obesidade, aptidão cardiorrespiratória, atividade física e tempo de tela em escolares da zona urbana e rural de Santa Cruz do Sul-RS. *Cinergis*. 2015;16(1): 52-56.

RODRIGUEZ, B. L. et al., Prevalence of cardiovascular disease risk factor in US children and adolescents with diabetes: the SEARCH for diabetes in your study. *Diabetes Care*, 2006

ROLO AP, TEODORO JS, PALMEIRA CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* ;52:59–69; 2012

ROSA GM, MEI R, DI CARLO G, PACILIO M, DI CARLOR. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A. 1. *Life Sci* 68: 921–931, 2001.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova*, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

- SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutrition hospitalaria*, 27 (1), 2012
- SARTORELLI, D. S. CARDOSO, M, Associação entre carboidratos da dieta e habitual e diabetes mellitus tipo 2: evidências epidemiológicas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.50, 2006.
- SATHE, S. K., D. K. SALUNKE, M. C. "Technology of removal of unwanted components of dry beans." *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 21.3. 263-287, 1984.
- SCHENKEL, E. P. et al., Saponinas. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre: ED. UFRGS, 2001.
- SCHNEEMAN, B. O. Dietary fibre and gastrointestinal function. *Advanced dietary fibre technology*, 2001.
- SHIGA, T. M. LAJOLO, F. M. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.)—Composition and structure. *Carbohydrate Polymers*. 63:1–12, 2006.
- SHIMELIS, E.A. RAKSHIT, S.K. Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. *Food Chemistry* 103: 161-172. 2007
- SHUTLER, S. M. The cholesterol-lowering effects of legumes li: effects of fibre, sterols, saponins and isoflavonas. *Human Nutrition, Food sciences and nutrition*, 1987.
- SINGH B, SINGH JP, SHEVKANI K, SINGH N, KAUR A. Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *J Food Sci Technol*. 2017
- SIDDIQ, M., RAVI, R. DOLAN, K. D. Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour. *LWT-Food Sci Technol*. 43:232–237, 2010.
- SOUZA, M. O. et al. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats, *Nutrition*. v. 26, p. 804-810, 2010.
- STEVENSON, D.E.; HURST, R.D. Polyphenolic phytochemicals-just antioxidants or much more? A review. *Cell. Mol. Life Sci*. 2007, 64, 2900-2916.
- STONE, et al., treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular disease risk in adults. *Annals of internal medicine*, 2014.
- STROBEL, N. A. et al., Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease, *Int J Cardiol*. 2011

- SURH, Y.J., KUNDU, J.K. & NA, H.K. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med.* **74**, 1526–1539; 2008.
- TARDIDO, A. P.; FALCÃO, M. C. O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade. *Rev Bras Nutr Clin*, v. 21, n. 2, p. 117-24, 2006.
- THARANATHAN RN, MAHADEVAMMA S. 2003. Grain legumes-a boon to human nutrition. *Trends Food Sci Technol* **14**: 507–18.
- THOMAS, D.E.; ELLIOTT, E.J.; BAUR, L. Low glycaemic index or low glycaemic load diets for overweight and obesity. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 18; 2007.
- THOMPSON, L. U. Antinutrients and blood glucose. *Food Technology*. 42:123-132, 1988.
- TIWARI, B. K. PANDEY, K. B. ABIDI, A. B. RIZVI S. I. “Markers of oxidative stress during diabetes mellitus,” *Journal of Biomarkers*, 2013.
- TOVAR, J. MELITO, C. Steam cooking and dry heating produce resistant starch in legumes. *J. Agric. Food Chem.* 441:2642–2645, 1996.
- TROMM, C. B. ROSA, G. L. BOM, K. MARIANO, I. Pozzi, B. TUON, T. SILVA, L. A. PINHO, R. A. Effect of different frequencies weekly training on parameters of oxidative stress. RBCDH. Santa Catarina. 2011
- UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos: TACO. Versão 2. Campinas, 2006.
- VALLE VEGA, P., FLORENTINO, B.L. Toxicología de Alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Nacional de Salud Ambiental, México D.F., 2000.
- VIANA, A. M. F. Efeito da Polpa de Pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) nas alterações hepáticas induzidas pela dieta hiperlipídica em ratos. Ouro Preto: Universidade de Ouro Preto, 2015. 110p. Dissertação de mestrado.
- XU, B. CHANG, S. K. C. Total Phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profile and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 57, 2009.
- ZAMIN JR, I. et al, The vitamin E reduces liver lipoperoxidation and fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis. *Arquivos de gastroenterologia*, 2010.
- ZAND RSR, JENKINS DJA, DIAMANDIS, EP. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. *J Chromatogr B*, 777: 219– 232, 2002.

ZHOU, Y., HOOVER, R. AND LIU, Q. Relationship between  $\alpha$ -amylase degradation and the structure and physicochemical properties of legume starches. *Carbohydrate Polymers*. 57:299–317, 2004.

WINA, E et al., The impact of saponin-containing plant materials on ruminant production, A review. *Journal of agriculture and food chemistry*, 2005

WU, W., WILLIAMS, W.P., KUNKEL, M.E., ACTON, J. C., HUANG, Y., WARDLAN, F. B., GRIMES, L. W. True protein digestibility and digestibility-corrected amino acid score of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington DC, v.43, n.5, p.1295-1298, 1995.

YANG X, DARKO KO, HUANG Y, HE C, YANG H, LI J, LI J, HOCHER B, YIN Y. Resistant starch regulates gut microbiota: structure, biochemistry and cell signaling. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 42(1): 306-318.

YOSHIDA, H., TOMIYAMA, Y. MIZUSHINA, Y. Characterization in the fatty acid distributions of Triacylglycerols and phospholipids in kidney beans *Phaseolus vulgaris L.*) *J. Food Lipids*. 12:169–180, 2005.