



Ação inibitória e estabilidade do extrato de farinha de feijão branco sobre enzimas digestivas na presença de fluido gástrico simulado

Inhibitory activity and stability of the white bean flour extract on digestive enzymes in the presence of simulated gastric fluid

Recebido em 13/01/2011

Aceito em 11/08/2011

Luciana L. S. Pereira^{1*}, Custódio D. dos Santos¹, Livia C. Sátiro¹, Silvana Marcussi¹, Chrystian A. Pereira², Stefânia P. de Souza³

¹Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, CP 3037, 37200-000 Lavras-MG, Brasil

²Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Campus I – ICBN, Praça Manoel Terra, 330, Centro, 38015-050, Uberaba - MG, Brasil

³Departamento de Química, Instituto Militar de Engenharia, Praça General Tibúrcio, 80, 22290-070 Rio de Janeiro-RJ, Brasil

RESUMO

Objetivou-se realizar ensaios de inibição de enzimas envolvidas na digestão de carboidratos (α -amilase e α -glicosidase) e de lipídios (lipase pancreática), pela farinha de feijão branco (FFB), visando detectar inibidores, e verificar a estabilidade destes frente o fluido gástrico simulado, além de uma triagem toxicológica pela análise de atividade hemolítica. Após a simulação do fluido gástrico as enzimas α -amilase e α -glicosidase foram inibidas pela FFB, revelando-se um importante mecanismo na redução da absorção de carboidratos da dieta e, conseqüentemente, um adjuvante ao tratamento da obesidade e do diabetes. Adicionalmente, não foi verificada ação hemolítica nos ensaios preliminares de toxicidade.

Palavras-chave: α -amilase, α -glicosidase, lipase, enzimas, inibidores enzimáticos

ABSTRACT

The aim of this work was to perform tests of inhibition of enzymes involved in digestion of carbohydrates (α -amylase and α -glucosidase) and lipids (lipase pancreatic) using the white bean flour (WBF), in order to detect inhibitors and to verify the stability of these in relation to simulated gastric fluid, and a toxicological screening analysis by hemolytic activity. After simulation of gastric fluid the enzymes α -amylase and α -glucosidase were inhibited by WBF, revealing a potential of reduction of the absorption of carbohydrates in the diet, and consequently an adjunct to treatment of obesity and diabetes. Additionally, there was no hemolytic action in preliminary toxicity tests.

Keywords: α -amylase, α -glucosidase, lipase, enzyme inhibitors

INTRODUÇÃO

A obesidade vem crescendo acentuadamente ao redor do mundo nos últimos anos e os potenciais riscos de sua prevalência e progressão envolvem as dislipidemias, hipertensão, doenças coronarianas e diabetes, entre outras (Mosca, 2008; Organização Pan-americana da Saúde, 2003). Atualmente, estão disponíveis diversos produtos para o controle do peso e diminuição da glicemia, incluindo do peso e diminuição da glicemia, incluindo

preparações farmacológicas e suplementos dietéticos, que objetivam restringir a absorção de energia, sendo a maioria constituída de extratos vegetais (Pittler, 2004, Dwyer, 2005). Especial atenção tem sido dada recentemente aos chamados “bloqueadores de amido”, embora não haja evidências científicas confiáveis da sua eficácia (Udani e 2004). Estes suplementos consistem de concentrados protéicos de feijão, que são conhecidos por conter altos

* **Contato:** Luciana Lopes Silva Pereira, Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, CP 3037, 37200-000, Lavras, MG, Brasil, e-mail: lucianalsp@yahoo.com.br

níveis de inibidor de α -amilase, uma proteína conhecida como faseolamina (α -AI). Além de ser uma fonte de nutrientes essenciais, o feijão (*Phaseolus vulgaris*) possui constituintes químicos que são considerados componentes com ação funcional, como os flavonóides, incluindo flavonóis, glicosilados ou não, antocianidinas, proantocianidinas e isoflavonas, bem como ácidos fenólicos (Lin *et al.*, 2008). Cabe aqui ressaltar que alimento funcional é um “alimento convencional ou similar a este em aparência, consumido como parte da dieta normal, que apresenta efeitos fisiológicos benéficos e/ou reduz o risco de doenças crônicas, além de suas funções nutricionais básicas” (Anvisa, 2002). Estudos realizados com diversas variedades de feijão demonstraram o seu potencial como alimento funcional, devido a sua ação na diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares, redução no índice glicêmico para portadores de diabetes, aumento na saciedade e na prevenção do câncer (Lião *et al.*, 2010). Acredita-se que por, eventualmente, impedir a digestão dos carboidratos complexos, este inibidor possa reduzir a disponibilidade calórica e de açúcares simples para serem absorvidos, promovendo assim a perda de peso e uma diminuição da glicemia (Boniglia *et al.*, 2008).

A prospecção de alternativas terapêuticas, principalmente de origem vegetal, apresenta-se como opção promissora para a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos, visto que a grande diversidade de espécies vegetais ainda não estudadas representa um vasto campo de moléculas a serem descobertas (Foglio *et al.*, 2006). Nesse contexto, alvos moleculares como enzimas e receptores têm sido estudados para a busca de medicamentos, baseados no mecanismo de inibição enzimática que ocasiona alterações benéficas no metabolismo e o uso no tratamento de doenças (Viegas Júnior *et al.*, 2006).

As enzimas amilase e glicosidase são responsáveis pelo processamento de carboidratos provenientes da dieta, atuando na quebra do amido e na absorção de monossacarídeos pelos enterócitos. Dessa forma, inibidores dessas enzimas, presentes em plantas oferecem uma estratégia promissora para o controle da hiperglicemia associada ao diabetes tipo 2, obesidade e hipertensão por meio da redução da quebra do amido e da absorção da glicose no intestino (Kwon *et al.*, 2006).

Adicionalmente, a lipase envolvida no metabolismo de lipídeos apresenta-se também como interessante alvo de inibidores, uma vez que sua inibição promove redução na absorção de triacilgliceróis da dieta, ocasionando diminuição do aproveitamento calórico e perda de peso (Viegas Júnior *et al.*, 2006).

Diante do exposto, o objetivo neste trabalho foi realizar ensaios de inibição de enzimas envolvidas na digestão de carboidratos (α -amilase e α -glicosidase) e de lipídios (lipase pancreática), com extrato bruto de farinha de feijão branco (FFB), *Phaseolus vulgaris*, visando detectar a atividade de inibidores, e verificar a estabilidade destes frente a um fluido gástrico simulado. Além de se realizar uma prévia triagem toxicológica da FFB pela análise de atividade hemolítica.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da farinha de feijão branco (FFB) e preparo do extrato

O feijão branco (*Phaseolus vulgaris*) foi cultivado em Campo Belo, MG, e adquirido em supermercado local. Os grãos com casca foram lavados com água destilada, e secos em estufa com circulação de ar a 30°C até peso constante. Para obtenção da farinha (FFB), os grãos foram triturados em moinho manual e em seguida em um moinho de facas (TE 631 Tecnal) para obtenção de uma farinha com granulometria menor ou igual a de 60 mesh.

As amostras foram misturadas com água destilada na proporção 1:5 (p/v) e colocadas em agitador horizontal em temperatura ambiente durante 1 hora. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 2.500 x g. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, denominado extrato bruto de farinha de feijão branco (EBFFB), foi utilizado nas análises de inibição das enzimas.

Obtenção das enzimas

Foram utilizadas nos ensaios a enzima α -amilase pancreática suína do tipo VI (SIGMA) e lipase suína tipo II (MERCK). As α -glicosidases foram obtidas a partir de duodeno suíno fresco cedido pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras. O tecido foi triturado em liquidificador com tampão Tris-HCl 0,5 mol L⁻¹, pH 8,0 a 4°C, para extração das enzimas das membranas dos enterócitos e processado em “mixer” até completa homogeneização. O homogeneizado foi filtrado em malha de náilon e centrifugado por 10 minutos, a 2.500 x g, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e utilizado como extrato enzimático.

Atividade das enzimas glicolíticas

Atividade de α -amilase

A atividade de α -amilase foi determinada segundo a metodologia proposta por Noelting & Bernfeld (1948), em que 50 μ L da amostra e 50 μ L de enzima α -amilase são pré-incubados, por 20 minutos, em banho-maria a 37°C. O substrato foi o amido 1% preparado em tampão Tris 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 acrescido de solução de NaCl 38 mmol L⁻¹ e de CaCl₂ 0,1 mmol L⁻¹. Após adição de 100 μ L do substrato, a mistura foi incubada por quatro períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 min.). A reação foi interrompida adicionando-se 200 μ L do reagente ácido 3,5 dinitrosalicílico e o produto da mesma lido em espectrofotômetro a 540 nm.

Atividade de α -glicosidase

A atividade de α -glicosidase foi determinada segundo Kwon e colaboradores (2006), utilizando solução de *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo 5 mmol L⁻¹ em tampão citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 como substrato. No ensaio, 50 μ L da amostra, 100 μ L de enzima e 50 μ L do substrato foram incubados em banho-maria, a 37°C, por quatro períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 min.). A reação foi interrompida adicionando-se 1 mL de solução de NaOH 0,05 mol L⁻¹ e a leitura do produto da mesma aferida em espectrofotômetro a 410 nm.

Atividade de lipase

Em cada análise, a mistura de 100 µL de lipase, 50 µL de EBFFB e 50 µL de substrato solução de *p*-nitrofenilpalmitato 8 mmol L⁻¹ em tampão Tris-HCl 0,05 mmol L⁻¹ pH 8,0 contendo 0,1% Triton-X100 foi incubada por quatro períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 min.). A reação foi paralisada transferindo-se os tubos para um banho de gelo e adicionando-se 1mL de tampão Tris-HCl 0,05 mmol L⁻¹ pH 8,0. O teor de *p*-nitrofenol, produto da ação da lipase sobre o *p*-nitrofenilpalmitato, de coloração amarela, foi lido em espectrofotômetro a 410 nm (Souza, 2009).

Determinação da inibição

A inibição das enzimas foi obtida a partir da determinação das inclinações das retas (absorbância x tempo) dos ensaios de atividade das enzimas controle (sem amostra) e enzimas + inibidor (com amostra). A inclinação da reta é decorrente da velocidade de formação de produto por minuto de reação e a presença do inibidor ocasiona uma diminuição nessa inclinação. A partir dessa inclinação, os valores de absorbância foram convertidos em µmol de produto por meio de uma curva padrão de glicose para a amilase e de *p*-nitrofenol para as glicosidases e para lipase. Para uma maior segurança dos resultados os controles foram preparados em água e em fluido gástrico simulado neutralizado, para eliminar a possível interferência deste na atividade das enzimas.

Fluido gástrico simulado

Com o objetivo de simular o processo de digestão no estômago, *in vitro*, foram também realizados os ensaios de atividades enzimáticas na presença de um fluido gástrico simulado. Para tal, o EBFFB foi incubado com o fluido gástrico simulado na proporção 1:1, preparado segundo a The United States Pharmacopeia – USP (1995) por 1 hora em banho-maria, a 37°C. Após esse período, o EBFFB em fluido foi neutralizado com o sal bicarbonato de sódio sólido até pH 7,2 e só então realizados os ensaios de atividade.

Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi realizada utilizando placas de Ágar Sangue (AS) 5% v/v, acrescidas com 0,01% de azida de sódio para evitar a proliferação de microorganismos. Amostras contendo 40 µL FFB (EBFFB) em 7 concentrações (65mg.mL⁻¹, 90mg.mL⁻¹, 115mg.mL⁻¹, 140mg.mL⁻¹, 165mg.mL⁻¹, 190mg.mL⁻¹ e 215mg.mL⁻¹) e o controle positivo (Triton X-100, 1%) foram inoculados em orifícios feitos no gel. Cada concentração do EBFFB e o controle positivo foram inoculados em triplicata nas placas, sendo estas incubadas a 37°C por 24 h. A atividade hemolítica é caracterizada pela presença de hemólise radial no local de inoculação das amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade das enzimas glicolíticas e da lipase na presença do EBFFB

Os resultados de inibição enzimática do EBFFB são apresentados na Tabela 1. A inibição expressa em porcen-

tagem é relativa à atividade da enzima na presença desse extrato com uma diluição que resulte em uma inibição entre 60 e 80% para garantir a confiabilidade dos resultados. Adicionalmente, a inibição foi também calculada em unidades de inibição; que representa a atividade de enzima inibida por grama de farinha de feijão branco.

Expressando a inibição de α-amilase em porcentagem, verifica-se 79,1% e 81,8% com e sem exposição do extrato ao fluido gástrico, respectivamente. Já para α-glicosidase a inibição foi de 70,0%, detectada apenas após a ação do fluido gástrico (Tabela 1). Tais percentuais estão dentro da faixa considerada como um bom perfil inibitório de enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos (Kwon *et al.*, 2006).

Venkateswaran & Pari (2003) constataram uma redução significativa dos níveis séricos de colesterol, triacilgliceróis, ácidos graxos livres, colesterol total e VLDL em ratos tratados com extrato aquoso de *Phaseolus vulgaris* por 45 dias. Em adição, vários autores relataram atividade anti-hiperlipidêmica atribuída ao feijão branco (Venkateswaran & Pari, 2003; Pari & Venkateswaran, 2004; Lee, 2006; Prolla, 2006). Contudo, neste trabalho, não foi detectada inibição da enzima lipase pancreática, envolvida no metabolismo lipídico pelo EBFFB, que poderia explicar eventuais reduções de lipídeos sanguíneos. Assim, outros mecanismos podem ser sugeridos para promoção deste efeito, que não a inibição da lipase pancreática: inibição da HMG-CoA redutase, estimulação da colesterol-7-α-hidroxilase (CYP7A1), que converte o colesterol em ácidos biliares, e/ou inibição da absorção do colesterol no intestino pela formação de complexos com compostos como os glicosídeos e as saponinas (Gaamoussi *et al.*, 2010).

Para a α-glicosidase, a exposição ao fluido gástrico ativou o inibidor; que não havia atuado sobre a enzima antes da simulação do fluido, conforme demonstrado na Figura 1. Tal fato sugere que o inibidor sofra alteração estrutural como a hidrólise de ésteres devido a alteração do pH. A hidrólise ocorre pela desestabilização da carbonila do grupo éster pelo íon hidrogênio (H⁺). Desta forma, a exposição das moléculas ao fluido gástrico pode acarretar modificações na estrutura do inibidor em decorrência do pH ácido e, neste caso, promover a inibição da enzima que antes da simulação do fluido gástrico não ocorria.

Apesar de haver muitos inibidores protéicos de α-amilases descritos e bem caracterizados, sua potencial aplicação farmacológica como auxiliar no tratamento de obesidade, diabetes ou outros distúrbios pode ser questionada. A dúvida é se as proteases e o pH ácido do fluido gástrico poderiam clivar as ligações peptídicas destes inibidores protéicos, levando à perda da atividade antes que a ação terapêutica ocorresse, como acontece em insetos (Silva *et al.*, 2001). A simulação do fluido gástrico mostrou que a inibição da α-amilase não foi alterada nas proporções utilizadas durante os ensaios, conforme demonstrado na Figura 2. Desta forma, sugere-se que o inibidor continuaria estável após a passagem pelo estômago durante a digestão.

A inibição das enzimas glicolíticas pode ser potencialmente utilizada como uma terapia complementar

Tabela 1 Inibição das enzimas digestivas α -amilase, α -glicosidase e lipase pelo EBFFB, com ou sem incubação do extrato com fluido gástrico simulado

Enzima	Incubação	% Inibição*	Unidade de inibição (UI g ⁻¹ FFB)*
α -amilase***	com fluido gástrico	79,1 ± 2,5	58,8 ± 3,9
	sem fluido gástrico	81,8 ± 1,3	54,1 ± 2,7
α -glicosidase**	com fluido gástrico	70,0 ± 0,0	530,0 ± 0,0
	sem fluido gástrico	0	0
lipase**	com fluido gástrico	0	0
	sem fluido gástrico	0	0

* média de 5 repetições ± desvio padrão

** Diluição do EBFFB 1:5

*** Diluição do EBFFB 1:10

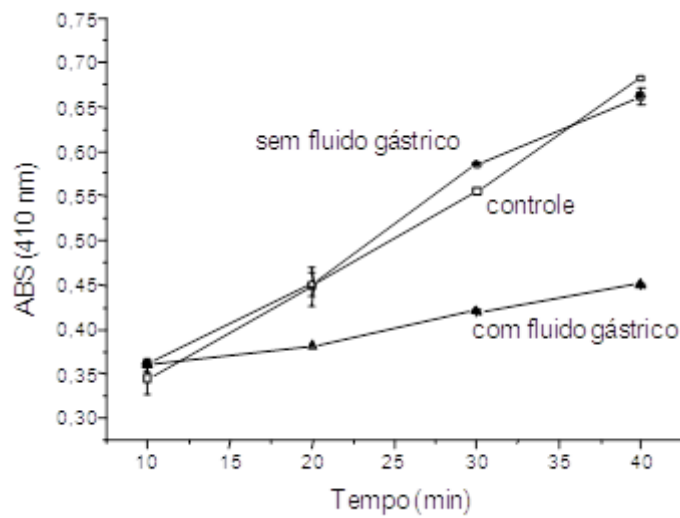


Figura 1. Atividade da α -glicosidase na ausência do EBFFB (controle □) e na presença do EBFFB com (▲) e sem (●) exposição ao fluido gástrico simulado

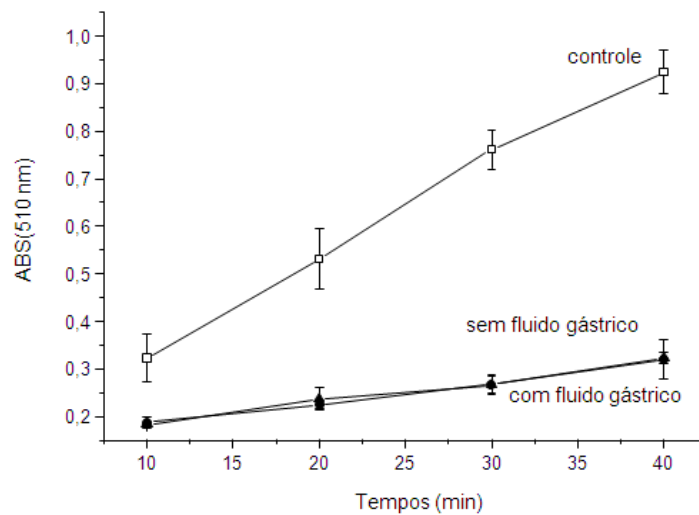


Figura 2. Atividade da α -amilase na ausência do EBFFB (controle □) e na presença do EBFFB com (▲) e sem (●) exposição ao fluido gástrico simulado

efetiva para hiperglicemia pós-prandial, com a vantagem de apresentar menos efeitos colaterais decorrentes da excessiva inibição de α -amilase pancreática sem a inibição da α -glicosidase, que resulta em aumento da fermentação

bacteriana anormal no cólon, de carboidratos não digeridos (Kwon *et al.*, 2006). Além disso, a forte inibição da α -glicosidase, não associada à inibição da α -amilase, provoca acúmulo excessivo de oligossacarídeos, como os

dissacarídeos no intestino distal, resultando na alteração dos fluidos osmóticos e em distúrbios intestinais que podem reduzir o tempo de contato entre a mucosa e os nutrientes existentes no intestino (Antunes, 2008). Diarréias e outros efeitos colaterais, como flatulência e cólica abdominal estão associados ao uso desses inibidores, além do desenvolvimento de tumores renais e danos hepáticos (Antunes, 2008). Desta forma, a FFB é promissora, já que inibe a α -amilase ($58,8 \pm 3,9$ UIA.g⁻¹ EBFFB), e a α -glicosidase ($530,0 \pm 0,0$ UIG.g⁻¹ EBFFB) após a simulação do fluido gástrico.

No ocidente os carboidratos correspondem de 40 a 50% das calorias ingeridas e constituem o principal componente da dieta na forma de amido ou de açúcares simples (Whitcomb & Lowe, 2007). Verifica-se, positivamente, que o EBFFB poderia apresentar efeito na diminuição da absorção de carboidratos *in vivo* por inibição de enzimas envolvidas na digestão. A presença dessa atividade inibitória pode explicar, portanto, parte dos efeitos emagrecedor e hipoglicemiante atribuídos à FFB, descritos na literatura (Antunes, 2008).

Avaliação toxicológica preliminar

O teste para verificação da ação hemolítica *in vitro* tem sido utilizado como uma das metodologias de triagem para diversos agentes tóxicos, sendo empregado por diversos autores para a avaliação toxicológica de plantas (Pequeno & Soto-Branco, 2006; Gandhi & Cherian, 2000; Mulky & Gandhi, 1977).

A saponina é um surfactante natural e foi detectada em feijões Kidney (*Phaseolus vulgaris* L.), conjugada com o DDMP (2,3-diidro-2,5,diidroxi-6-metil-4H-pirano-4-ona (Cardénas *et al.*, 2008). Os compostos surfactantes produzem efeito hemolítico por dois possíveis mecanismos. Um dos mecanismos propostos é a ocorrência de solubilização da membrana plasmática do eritrócito, que romperia por se tornar mais frágil. Outra hipótese é a ocorrência de lise osmótica, por meio da alteração da permeabilidade da membrana plasmática da hemácia (Aparicio *et al.*, 2008).

Por outro lado, os compostos xenobióticos reduzidos, como, por exemplo, os compostos fenólicos, são capazes de promover hemólise por meio da oxidação da hemoglobina, formando meta-hemoglobina (Bukowska & Kowalska, 2004). Segundo Cardénas e colaboradores (2008) o feijão branco cru apresenta teor de catequina de aproximadamente 33,38 mg/100g de feijão, valores bem inferiores aos encontrados nos feijões preto e carioca (61,01 mg/100g e 102,45 mg/100g, respectivamente).

Apesar da presença de agentes hemolíticos como as saponinas e compostos fenólicos, constatou-se que o EBFFB, quando inoculado em placas de AS, não apresentou atividade hemolítica em todas as concentrações testadas. Por outro lado, o uso de solução de Triton X100 1%, como controle positivo, promoveu halo de hemólise de 5,7 mm; validando o processo, evitando resultados falso negativos. Entretanto, o teste de hemólise *in vitro* serve apenas como triagem para avaliação de toxicidade, sendo ainda necessária a realização de análises complementares e ensaios biológicos com animais.

CONCLUSÕES

Após a simulação do fluido gástrico as enzimas glicolíticas (α -amilase e α -glicosidase) foram inibidas pelo EBFFB, revelando-se um potencial redutor da absorção de carboidratos da dieta e, conseqüentemente, um promissor adjuvante ao tratamento da obesidade e do diabetes. Adicionalmente, não foi verificada ação hemolítica nos ensaios preliminares de toxicidade.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Antunes, AF. *Atividade inibitória de extratos vegetais do cerrado sobre a α -amilase*. 2008. Brasília. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasil.
- Anvisa *Informe Técnico nº01 (RDC nº02, 07/01/2002)*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em novembro de 2011.
- Aparicio, RM; García-Celma, MJ; Vinardell, MP; Mitjans, M. *In vitro studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes*. *J. Pharm.Biom. Anals.* 39: 1063-1067, 2005.
- Boniglia, C; Carratù, B; Stefano, S; DI; Giammarioli, S; Mosca, M; Sanzini, E. *Lectins, trypsin and α -amylase inhibitors in dietary supplements containing *Phaseolus vulgaris**. (*Eur. Food Res. Tech.* 227 (3): 689-693, 2008.
- Bukowska, B; Kowalska, S. *Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes*. *Toxicol. Lett.* 152: 73-84, 2004.
- Cardénas, LLAR; Leonel, AJ; Costa, NMB. *Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 28 (1): 200-213, 2008.
- Dwyer, JT; Allison, DB; Coates, PM. *Dietary supplements in weight reduction*. *J Am Diet Assoc.* 105 (5): 80-86, 2005.
- Foglio, MA; Queiroga, CL; Sousa, IMO; Rodrigues, RAF. *Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar construindo a história dos produtos naturais*. *MultiCiência.* 7: 1-8, 2006.
- Gaamoussi, F.; israili, Z.; Lyoussi, B. *Hypoglycemic and hypolipidemic effects of an aqueous extract of *Chamaerops humilis* leaves in obese, hyperglycemic and hyperlipidemic meriones shawi rats*. *Pak. J. Pharm. Sci.* 23 (2):212-219, 2010.
- Gandhi, VM. & Cherian, KM. *Red cell haemolysis test as an in vitro approach for the assessment of toxicity of karanja oil*. *Toxicol. In Vitro.* 14: 513-516, 2000.
- Kwon, YI; Apostolidis, E; Shetty, K. *Inhibitory potential of wine and tea against α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes*. *J. Food Biochem.*

32 (1): 15-31, 2006.

Lee, JS. Effects of soy protein and genisteína on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*. 79 (16): 1578-1584, 2006.

Lião, LM; Choze, R; Cavalcante, PPA.; Santos, SC.; Ferri, PH.; Ferreira, AG. Perfil químico de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) pela técnica de High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS). *Quim. Nova*. 33 (3): 634-638, 2010.

Lin, LZ; Harnly, J M; Pastor-Corrales, MS; Luthria, DL. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem*. 107: 399-410, 2008.

Mosca, M; Boniglia, C; Carratu, B; Giammaroli, S; Nera, V; Sanzini, E; Determination of α -amilase activity of phaseolamin from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in dietary supplements by HPAEC-PAD. *Anal. Chim. Acta*. 617: 192-195, 2008.

Mulky, MJ. & Gandhi, VM. Mowrah (*Madhuca latifolia*) seed saponin. Toxicological studies. *J. Appl. Chem. Biotechnol*. 27: 708-713, 1977.

Noelting, G; Bernfeld, P. Sur les enzymes amylolytiques III. La amylase: dosage d'activate et controle de l' α -amilase. *Helv. Chim. Acta*. 31 (1): 286-290, 1948.

Organização Pan-Americana Da Saúde. Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. Brasília, DF, 60 p. 2003.

Pari, L; Venkateswaran, S. Protective role of *Phaseolus vulgaris* on changes in the fatty acid composition in experimental diabetes *J Medic. Food*. 7 (2): 204-209, 2004.

Pequeno, NF; Soto-Branco, B. Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34 (1): 45-48, 2006.

Pittler, MH; Ernst, E. Dietary supplements for body-weight reduction: a systematic review *Am J Clin Nutr*. 79 (4): 529-536, 2004.

Prolla, IRD. *Características físico-químicas de cultivares de feijão (Phaseolus vulgaris L.) e efeitos biológicos da fração fibra solúvel*. 2006. Santa Maria. 84 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.

Silva, HH; Terra, WR; Grossi-de Sá, MF; Samuels, RI; Isejima, EM; Bifano, TD; Almeida, JS. Induction of digestive α -amilase in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α -amilase inhibitor 1. *J. Insect Physiol*. 47: 1283-290, 2001.

Souza, SP. *Ação inibitória de extratos de plantas sobre lipase pancreática com ênfase em Baccharis trimera (Less.) DC*. 2009. Lavras. 84 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

The United States Pharmacopeia. The national formulary NF 18 (Pharmacopeial Convention Ing). Rockvile, 1995.

Udani, J; Hardy M, Madsen, DC. Blocking carbohydrate absorption and weight loss: a clinical trial using Phase 2™ Brand proprietary fractionated white bean extract. *Altern Med Rev*. 9:63-69, 2004.

Venkateswaran, S; Pari, L. Effect of *Coccinia indica* leaves on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, 84: 163-168, 2003.

Viegas Júnior, C; Bolzani, VS; Barreiro, EJ. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim. Nova*, 29 (2): 326-337, 2006.

Whitcomb, DC; Lowe, ME. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci*. 52: 1-17, 2007.